

Muokattujen lipoproteiinien vaikutus makrofageihin ja endoteelisoluihin

Aapeli Kemppainen

Lääketieteen kandidaatti

Helsingin yliopisto

Helsinki 2.8.2019

Tutkielma

aapeli.kemppainen@helsinki.fi

Ohjaaja: Katariina Öörni

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Biokemia	
Tekijä – Författare – Author Aapeli Kemppainen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Muokattujen lipoproteiinien vaikutus makrofageihin ja endoteelisoluihin			
Oppiaine – Läroämne – Subject Biokemia			
Työn laji – Arbetets art – Level Syventävät opinnot	Aika – Datum – Month and year 2.8.2019	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 37+9	
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Ateroskleroosi on maailmanlaajuisesti merkittävä, hitaasti kehittyvä suurten ja keskisuurten valtimoiden sairaus, jonka komplikaatiot aiheuttavat huomattavan määrän kuolemia ja sairaalahoidon tarvetta vuosittain. Sairautta on pidetty aikaisemmin aineenvaihdunnallisena tilana, jossa verisuonissa kiertävä kolesterolin kertyy verisuonen seinämään, mutta yhä enemmän ateroskleroosi mielletään tulehdukselliseksi sairaudeksi, jossa jatkuva matala-asteinen tulehdus on keskeinen tekijä taudin patogeneesissä. Nykyinen lääkehoito perustuu pitkälti hyperkolesterolemian hoitoon, mutta tulehdusta hoitamalla on myös onnistuttu vähentämään sydän- ja verisuonitapahtumia ja tulevaisuudessa tulehduksen lääkehoito voi korostua.</p> <p>Lipoproteiinien merkitystä ateroskleroosin patogeneesissä ei voida kiistää, sillä ilman sopivaa lipoproteiiniprofiilia (veressä) ei voi tautia kehittyä. Lipoproteiinit kantavat veressä lipidejä ja pääsevät verenkierron verisuonen seinämään. Seinämässä lipoproteiinit altistuvat monenlaiselle muuntumiselle. Monet hapettavat tekijät, fosfolipaasi, sfingomyelinaasi sekä muut entsyymit muokkaavat lipoproteiinien, ennen kaikkea LDL:n (low density lipoprotein), rakennetta, jolloin ne sitoutuvat helpommin verisuonen seinämässä solunulkoiseen tilaan, aggregoituvat sekä päätyvät makrofagien fagosytoimiksi. Epätasapaino lipoproteiinien kuljettamien lipidien virtauksessa verisuonen seinämään ja siitä pois johtaa lopulta lipidien kertymiseen.</p> <p>Makrofagit ovat tärkeitä soluja sekä verisuonen seinämän normaalissa aineenvaihdunnassa että ateroskleroosin kehityksessä. Fagosytoituaan lipoproteiineja makrofagi prosessoi ne ja luovuttaa ylimääräisen kolesterolin eteenpäin. Kun kolesterolia kertyy soluun enemmän kuin mitä se pystyy luovuttamaan, muodostuu vaahtosoluja, jotka sisältävät ylimäärin kolesterolia ja muita lipidejä. Lipoproteiinien kertyessä makrofageihin, ne erittävät tulehdusta edistäviä välittäjäaineita. Endoteelisolut ovat toinen merkittävä solutyyppi verisuonen seinämässä. Ne säätelevät verisuonen läpäisevyyttä ja niihin vaikuttavat erityisesti muiden solujen erittämät välittäjäaineet. Myös lipoproteiineilla on suoria vaikutuksia endoteelisoluihin.</p> <p>Tässä tutkimuksessa altistettiin makrofageja ja endoteelisoluja luontaisille sekä muokatuille lipoproteiineille. Makrofagien osalta tavoitteena oli tutkia, miten lipoproteiinit vaikuttavat niiden interleukiinien (IL) eritykseen ja miten lipoproteiinien koko muuttuu altistuksen aikana. Endoteelisolujen kohdalla selvitettiin myös, miten lipoproteiinit vaikuttivat solujen geenien luentaan. Hapetetun VLDL:n (very-low density lipoprotein) todettiin aiheuttavan IL-1β-erityksen makrofageista. Muilla muokatuilla lipoproteiineilla ei löydetty olevan tilastollisesti merkitsevää vaikutusta IL-1β- tai IL-18- eritykseen. Endoteelisolut eivät erittäneet kyseisiä interleukiineja vuorokauden lipoproteiinialtistuksen jälkeen. Sekä makrofagit että endoteelisolut pienensivät VLDL:n ja hapetetun VLDL:n partikkelikokoa. LDL-partikkeleiden osalta makrofagit pienensivät lähinnä vain sfingomyelinaasilla muokatun LDL:n partikkelikokoa. Endoteelisolujen geenien luennassa ei havaittu muutosta endoteelisoluille ominaisista geeneistä mesenkymaalisoluille ominaisiin geeneihin, vaikka valomikroskoopilla nähtiin muutos endoteelisolujen morfologiassa.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Makrofagi, LDL, VLDL, modifikaatio, endoteelisolu			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited E-thesis			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällysluettelo:

1	JOHDANTO.....	1
2	LIPOPROTEIINIT	3
2.1	Rakenne	3
2.2	Luokittelu	3
2.3	Aineenvaihdunta	4
2.4	Modifikaatiot	5
2.4.1	Hapettuminen.....	5
2.4.2	PLA2	6
2.4.3	SMase	7
3	MAKROFAGIT JA ENDOTEELISOLUT	9
3.1	Makrofagit	9
3.1.1	Yleistä.....	9
3.1.2	Toiminta.....	9
3.2	Endoteelisolut.....	12
3.2.1	Yleistä.....	12
3.2.2	Uusiutuminen	12
3.2.3	Endoteelisolujen muutos mesenkymaalisolujen kaltaisiksi	13
4	ATEROSKLEEROOSIN PATOGENEESI	14
4.1	Valtimon seinämän rakenne.....	14
4.2	Kolesterolin kertyminen valtimon seinämään	15
4.3	Vahtosolujen muodostuminen	17
4.4	Tulehdus	18
4.5	Ateroskleroottinen plakki	20
4.6	Plakin komplikaatiot	21
5	MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	22
5.1	Monosyyttien eritys.....	22
5.2	Endoteelisolujen eristys.....	22
5.3	Lipoproteiinien eristys	23

5.4	Lipoproteiinien modifikaatiot.....	23
5.4.1	Hapetus.....	23
5.4.2	PLA ₂ -modifikaatio	23
5.4.3	Smase-modifikaatio	24
5.5	Solukokeet	24
5.5.1	Makrofagit	24
5.5.2	Endoteelisolut.....	25
5.6	Makrofagien solunäytteiden kerääminen	25
5.7	Proteiinien määrittäminen	25
5.8	ELISA	25
5.9	Partikkelikoon määrittäminen	26
5.10	RNA:n eristys	26
5.11	cDNA:n valmistus.....	26
5.12	PCR.....	26
5.13	Tilastolliset menetelmät	26
6	TULOKSET.....	28
6.1	Lipoproteiinien vaikutus makrofagien interleukiinieritykseen	28
6.2	Lipoproteiinien partikkelikoon muutos makrofagitutkimuksissa.....	30
6.3	Lipoproteiinien vaikutus endoteelisoluihin	31
7	TULOSTEN TARKASTELU	34
	Lähdeluettelo	38

1 Johdanto

Ateroskleroosi on suuriin ja keskisuuriin valtimoihin hitaasti kehittyvä tulehdussairaus. Aikaisemmin se nähtiin aineenvaihdunnallisena sairautena, jossa kolesteroli kertyy valtimon seinämiin, mutta tulehduksen merkitys sairauden patogeneesissä on korostunut jatkuvasti. CANTOS-tutkimus osoitti vuonna 2017, että ateroskleroosin aiheuttamia sydän- ja verisuonitapahtumia pystyttiin estämään tulehdusta hillitsevällä lääkehoidolla (1). On myös todettu, että CRP, joka on klassinen akuutin tulehduksen merkkiaine, ennustaa sydän- ja verisuonitapahtumia jopa tavallisia ennustavia tekijöitä, kuten LDL-kolesterolia, paremmin (2).

Tulehdusta korostavien tutkimusten tulokset eivät kuitenkaan horjuta kolesterolin ja sitä kuljettavien lipoproteiinien merkitystä ateroskleroosin kehittymisessä. Ilman ateroskleroosin kannalta sopivaa lipoproteiiniprofiilia ei ateroskleroosi pysty kehittymään. Lisäksi statiinilääkitys on osoittanut, että ateroskleroosin komplikaatioita pystytään vähentämään estämällä kolesterolin synteesiä ja siten vähentämällä LDL-kolesterolin määrää veressä (3). Luontaiset lipoproteiinit eivät ole kuitenkaan kovin aterogeenisiä, mutta niitä muokataan verisuonen intimassa monien entsyymien ja reaktiivisten yhdisteiden vaikutuksesta. Nämä muokatut lipoproteiinit puolestaan aiheuttavat voimakkaammin kolesterolin kertymistä suonen seinämään. Muokattuja LDL-partikkeleita tutkimalla on saatu tarkempaa tietoa ateroskleroosin patogeneesistä. Nykyään tutkitaan esimerkiksi geneettisistä syistä johtuvia eroavuuksia lipoproteiinien rakenteessa, jotta voitaisiin tunnistaa, keillä on suurin riski ateroskleroosin ja sen komplikaatioiden ilmenemiseen.

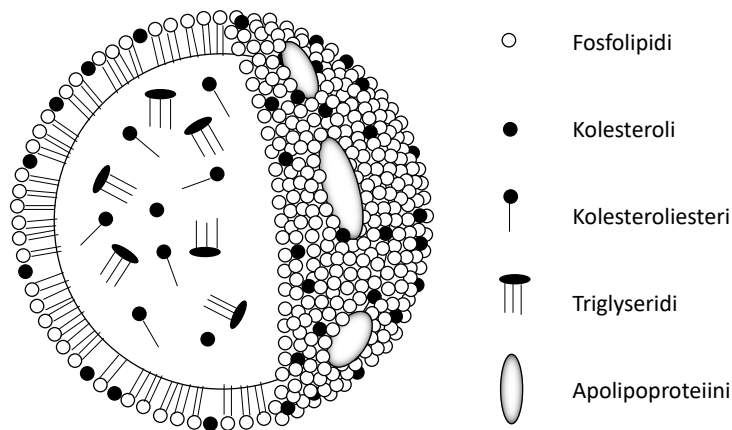
Geneettiset tekijät ovat merkittävä ateroskleroosin riskitekijä, mutta elämäntavoilla pystyy vaikuttamaan ratkaisevasti taudin ilmenemiseen. Epäterveellinen ruokavalio, tupakointi, lihavuus, vähäinen liikunta ja stressi ovat esimerkkejä riskitekijöistä, joihin kaikki pystyvät vaikuttamaan omalta osaltaan. Muun muassa lipoproteiiniprofiiliin yllä mainitut elämäntavat vaikuttavat negatiivisesti. Huonot elämäntavat eivät koske vain kehittyneitä maita vaan koko maailmaa. Ateroskleroosi ja sen komplikaatiot ovatkin maailmanlaajuisesti johtava sairastuvuuden ja kuolleisuuden aiheuttajia (3).

Tämä tutkimus on suoritettu viljelemällä makrofageja ja endoteelisoluja, jotka ovat keskeisiä soluja ateroskleroosin patogeneesin kannalta, ja altistamalla niitä muokatuille lipoproteiinipartikkeleille. Makrofagien osalta tutkittiin, miten altistus lipoproteiineille vaikuttaa niiden tulehdusta edistävien välittäjäaineiden eritykseen. Lisäksi seurattiin, miten lipoproteiinien partikkelikoko muuttuu. Endoteelisolujen kohdalla selvitettiin, minkälainen vaikutus muokatuilla lipoproteiineilla on solujen geenien ilmentämiseen. Tutkittiin myös, johtaako altistus lipoproteiineille endoteelisoluissa tulehdusta edistävien välittäjäaineiden tuotantoon ja miten lipoproteiinien partikkelikoko muuttuu.

2 Lipoproteiinit

2.1 Rakenne

Lipoproteiinit muodostuvat lipideistä ja proteiineista. Lipoproteiinin ytimessä on rasvaliukoisia lipidejä, kuten triglyseridejä ja kolesteroliestereitä. Kuorikerroksen puolestaan muodostavat amfipaattiset fosfolipidit sekä apolipoproteiinit, jotka yhdessä vastaavat lipoproteiinin vesiliukoisuudesta. Yleisrakenne on esitetty kuvassa 1. Esteröitymätöntä kolesterolia on sekä ytimessä että kuorikerroksella (4). Lisäksi lipoproteiinit voivat sisältää rasvaliukoisia antioksidantteja (5).



Kuva 1. Lipoproteiinin yleisrakenne

2.2 Luokittelu

Lipoproteiinien luokittelu perustuu tiheyteen, joka puolestaan riippuu lipoproteiinin lipidi- ja proteiinikoostumuksesta. Keskeisiä eroja on esitetty taulukossa 1. Tiheyserojen perusteella kylomikronit, VLDL (very-low density lipoprotein), IDL (intermediate density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) ja HDL (high density lipoprotein) on mahdollista erottaa ultrasentrifuugilla veriplasmasta (6). Kylomikronit koostuvat lähes kokonaan (98-99%) lipideistä, joista suurin osa on triglyseridejä. Myös VLDL:n lipidirikkaasta rakenteesta suurin osa triglyseridejä, mutta sen aineenvaihduntatuotteella, LDL-partikkelilla, kolesteroliesteri muodostaa suurimman

osan lipideistä. VLDL-LDL-metabolian välivaiheen, IDL:n, lipidikoostumus on kahden edellisen väliltä. HDL-partikkeleissa on vähän triglyseridejä ja enemmän fosfolipidejä ja kolesterolia (7). Proteiinien suhteellinen määrä kylomikroneissa ja VLDL-partikkeleissa on pieni (2% ja 8%). Osuus kasvaa IDL- ja LDL-partikkeleissa ja suurin se on HDL-partikkeleissa (33-57%) (4).

Lipoproteiinit voidaan jakaa edelleen alaluokkiin monien ominaisuuksien, kuten jo mainittujen tiheyden tai lipidikoostumuksen, perusteella (8). Erityisesti LDL:n osalta alaluokkien välillä on löydetty kliinisissä tutkimuksissa eroavaisuuksia. Pienen, tiheän LDL:n (sd-LDL) yhteys sydän- ja verisuonisairauksien riskiin on todettu monissa tutkimuksissa (9,10). Lipidikoostumuksen on puolestaan havaittu vaikuttavan LDL:n aggregoitumisherkkyyteen ja siten sydänkuoleman riskiin (11). Kolesterolirikkaan LDL:n apolipoproteiiniin B100 voi olla liittynyt apolipoproteiini(a), jolloin partikkeliä kutsutaan lipoproteiini(a):ksi. Sen on havaittu liittyvän itsenäisesti lisääntyneeseen sydän- ja verisuonisairauksien riskeihin (12).

Lipoproteiini	Tiheys (g/ml)	Halkaisija (nm)	Apolipoproteiinit
Kylomikroni	< 0,950	75 – 1200	B48, A1, A4, C1, C2, C3
VLDL	0,950 – 1,006	30 – 80	B100, C1, C2, C3, E
IDL	1,006 – 1,019	15 – 35	B100, E
LDL	1,019 – 1,063	18 – 25	B100
HDL	1,063 – 1,210	7,5 – 20	A1, A2, C1, C2, C3, D, E

Taulukko 1. Lipoproteiinien fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia (4)

2.3 Aineenvaihdunta

Kylomikronit tuotetaan ja eritetään suoliston enterosyyteissä, joista ravinnosta absorboidut lipidit kulkeutuvat kylomikroneissa imusuoniston kautta verenkiertoon, jossa lipoproteiinilipaasi (LPL) siirtää niistä rasvahappoja kudoksiin. Samalla kylomikronien koko pienenee ja lopulta maksa poistaa nämä jäännöshiukkaset (remnantit) verenkierrosta (13). Maksa puolestaan erittää verenkiertoon VLDL-

partikkeleita, joista samaan tapaan lipolysoidaan rasvahappoja perifeerisiin kudoksiin. Tällöin partikkelin koostumus muuttuu. Ensin siitä tulee IDL, jonka jälkeen LDL. Verenkierrosta LDL päätyy maksaan tai perifeerisiin kudoksiin, joissa sen sisältämää kolesterolia voidaan käyttää muun muassa solukalvon rakenteena sekä steroidihormonien rakennusaineena.

HDL:n esiasteita erittyy maksasta ja suolistosta. Tärkeä osa rakennetta on apolipoproteiini A1. HDL kerää kolesterolia perifeerisistä kudoksista ja kuljettaa sitä maksaan ja muille kudoksille sekä siirtää sitä VLDL- ja LDL-partikkeleihin, joissa se kulkeutuu edelleen maksaan. HDL:n metaboliassa vaikuttavat monet entsyymit: lesitiini-kolesteroli asetyylitransferaasi (LCAT) esteröi vapaata kolesterolia, kolesteroliersterin siirtäjäproteiini (CETP) siirtää hydrofobisia lipidejä HDL:n ja apolipoproteiini (apo) B:tä sisältävien lipoproteiinien välillä ja maksalipaasi (HL) siirtää HDL:stä lipidejä maksaan (14).

2.4 Modifikaatiot

2.4.1 Hapettuminen

Lipoproteiinien, erityisesti LDL:n, hapettuminen voi tapahtua monella tavalla. Reaktiiviset happiradikaalit (ROS), kupari, rauta ja monet entsyymit, kuten myeloperoksidaasi (MPO) voivat kaikki hapettaa LDL-partikkeleita (4). Hapettajasta riippuen muutokset ovat hieman erilaisia, mutta jo vähäinkin hapetus lisää partikkeleiden aggregaatiota (5). VLDL voidaan myös hapettaa (15) ja hapetetun VLDL:n on havaittu vaikuttavan muun muassa siihen, kuinka makrofagit hajottavat lipoproteiineja (16).

Hapetus vaikuttaa LDL-partikkelissa sekä proteiineihin että lipideihin. Hapettaja voi muokata apoB100 -apolipoproteiinin lysiiniryhmiä, jolloin LDL:n kokonaisvaraus muuttuu negatiivisemmaksi (17). Tällöin makrofagien fagosytoivat LDL-partikkeleita herkemmin jätereseptoreiden (scavenger-reseptorit) välityksellä (18). Oksidatiiviset muutokset apoB100:ssa vaikuttavat myös LDL:n aggregoitumiseen sekä fuusioon. Muutokset voivat johtaa proteiinin hydrofobisten alueiden siirtymiseen partikkelin

pinnalle tai tietyt aineet, kuten malondialdehydi (MDA), kiinnittyvät proteiinin rakenteeseen lisäten partikkeleiden aggregaatioherkkyyttä (19). Lipideihin kohdistuvan hapetuksen seurauksena muodostuu pääasiassa hapetettuja fosfolipidejä (Ox-PL, oxidized phospholipid), joilla on monia ateroskleroosin kehittymistä edistäviä vaikutuksia, kuten tulehduksen voimistaminen (20). Lisäksi hapetus altistaa fosfolipidit muille modifikaatiolle, jotka johtavat muun muassa lisääntyneeseen aggregaatiotaipumukseen (19).

Hapettumiselta kehossa suojaavat antioksidantit ja lipoproteiinit kantavat mukanaan joitakin rasvaliukoisia antioksidantteja, kuten E-vitamiinia. Sen on todettu estävän LDL-partikkeleihin kohdistuvaa hapetusta (21) ja väistämättä oksidatiiviset muutokset johtavat E-vitamiinin ja muiden antioksidanttien vähenemiseen (5). Antioksidanttilisistä, ainakaan E-vitamiinin suhteen, ei ole todettu olevan ratkaisevaa etua hapetuksen estämisessä ja siten mahdollisesti ateroskleroosista seuraavien komplikaatioiden ehkäisyssä (22). Tämän ajatellaan johtuvan siitä, että elimistössä on useita lipoproteiineja hapettavia tekijöitä, eivätkä tietyt antioksidantit pysty ehkäisemään tehokkaasti niitä kaikkia (23). Hapettunutta fosfolipidiä vastaan on puolestaan olemassa luonnollinen vasta-aine, E06, joka tunnistaa spesifisesti Ox-PL:n ja sen on transgeenisillä hiirillä todettu vähentävän ateroskleroosia (24).

2.4.2 PLA₂

Fosfolipaasi A₂ (PLA₂) on entsyymi, joka erittyy tulehduksen vaikutuksesta monista solutyypeistä ja ateroskleroottisissa plakeissa makrofagien on todettu erittävän sitä (25,26). PLA₂ hydrolysoi diasyyglyserolifosfolipidiltä rasvahapon sn2-positiosta, jolloin vapautuu rasvahappo ja lysofosfatidyylikoliini (lysoPC) (19). Modifikaatiolla on suoria vaikutuksia LDL-partikkelin rakenteeseen sekä epäsuoria vaikutuksia soluihin signaaloinnin välityksellä.

Oksidatiiviset muutokset LDL:n fosfolipideissä tekevät ne alttiiksi joidenkin PLA₂-entsyymien vaikutukselle (27). Hydrolyysi saa aikaan LDL-partikkelin kuorikerroksen tiiviimmän pakkautumisen sekä hieman pienentää partikkelikokoa (5). PLA₂ lisää LDL-partikkelien aggregaatiota edellyttäen, että albumiini irrottaa hydrolyysin seurauksena

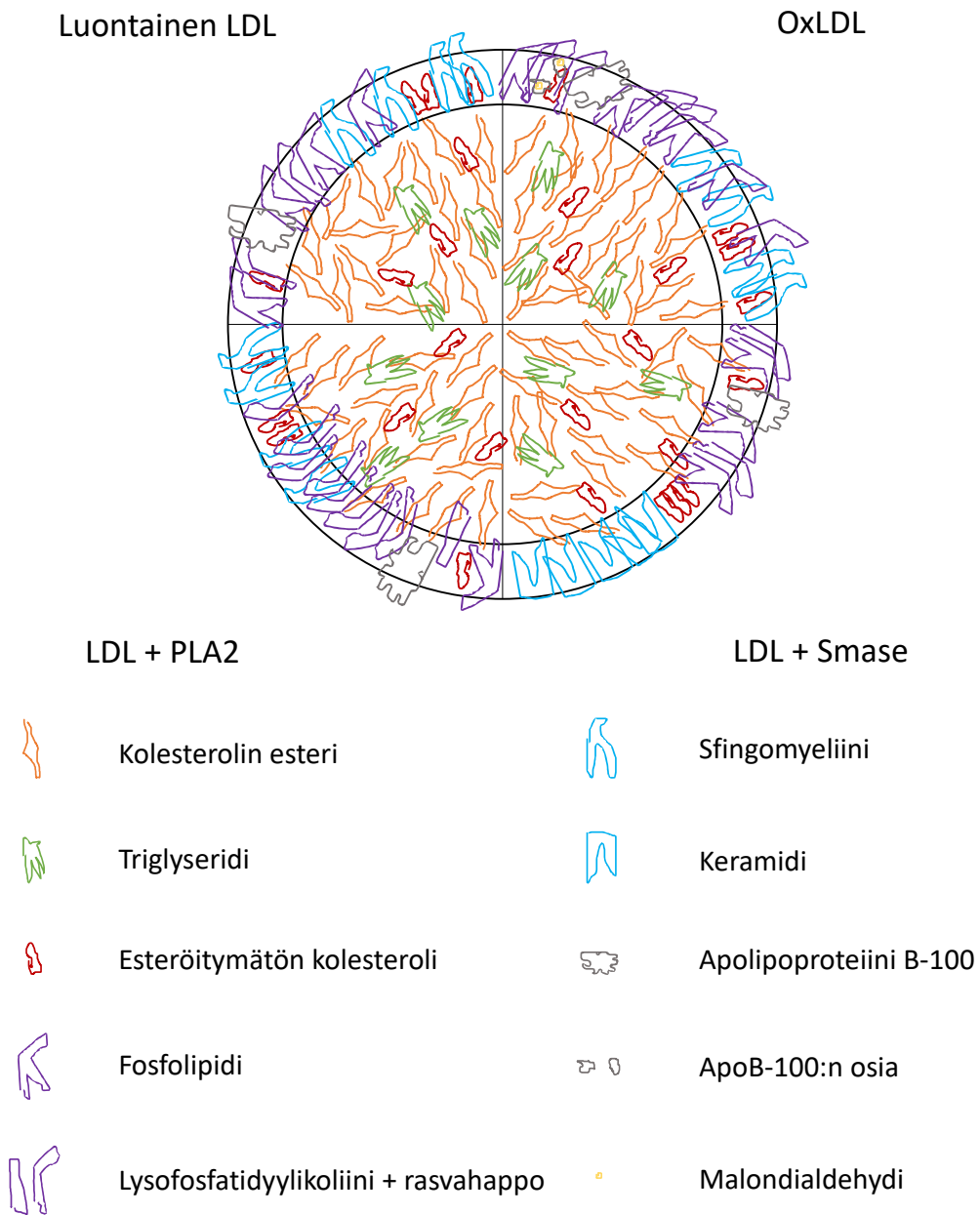
muodostuneen rasvahapon LDL-partikkelista, mutta partikkelien fuusioita se ei lisää (28). Muutokset LDL-partikkeleissa johtavat siihen, että makrofagit fagosytoivat niitä luontaisia LDL-partikkeleita enemmän (29).

Modifikaation seurauksena muodostuvalla lysoPC:lla on puolestaan LDL-partikkelin rakenteesta riippumattomia aterogeenisiä vaikutuksia. Se on lipidivälittäjäaine, joka lisää T-solujen ja makrofagien kemotaksista sekä saa aikaan makrofageissa tulehduksen välittäjäaineiden muodostumista ja endoteelisoluissa adheesiomolekyylien ilmentymisen lisääntymistä (27). Kliininen merkitys lysoPC-määrän sekä sydän- ja verisuonisairauksien välillä on kuitenkin edelleen epäselvä (30). Hapettuneiden fosfolipidien hydrolyysin seurauksena voi muodostua lysoPC:n lisäksi hapettunut esteröitymätön rasvahappo (oxNEFA, oxidized nonesterified fatty acid), joka on makrofageille sytotoksinen (27).

2.4.3 SMase

Sfingomyelinaasi (SMase) erittyy fibroblasteista, makrofageista sekä endoteelisoluista (31) ja irrottaa sfingomyeliinistä fosfokoliiniryhmän, joka irtaana hydrofiilisenä lipoproteiinista ja jäljelle jää hydrofobinen keramidi (5). Siten SMase muuttaa LDL-partikkelin kuorikerroksen liukoisuutta, joka edelleen vaikuttaa partikkelin käyttäytymiseen solun ulkoisessa tilassa (32). Modifikaatio lisää sekä LDL:n aggregaatiota että fuusioita (28).

SMase:n toiminta on riippuvainen ympäristön pH:sta (32). Neutraalissa pH:ssa se pystyy hydrolysoimaan vain, jos LDL-partikkelia on modifioitu aikaisemmin esimerkiksi PLA₂:lla tai proteaaseilla (33,34). Keramidien kertyminen LDL:n pinnalle johtaa partikkeleiden välisten hydrofobisten vuorovaikutusvoimien lisääntymiseen ja sitä kautta niiden aggregoitumiseen (19). Happamassa pH:ssa SMase pystyy puolestaan modifioimaan luontaista LDL-partikkelia ja näissä olosuhteissa lisääntynyt aggregaatio johtuu SMase:n vaikutuksista LDL-partikkelin apoB100-apolipoproteiiniin (32). Ateroskleroottisessa plakissa on pääasiassa happamassa ympäristössä toimivaa SMase:a.



Kuva 2. LDL:n modifikaatiot (5)

3 Makrofagit ja endoteelisolut

3.1 Makrofagit

3.1.1 Yleistä

Makrofagit mielletään immuunipuolustuksen soluiksi, mutta niillä on monia muitakin tärkeitä tehtäviä. Ne osallistuvat muun muassa yksilönkehitykseen, homeostaasin ylläpitoon sekä haavojen parantumiseen (35). Makrofagit ovatkin heterogeeninen ryhmä soluja ja niiden toiminta vaihtelee kudosten välillä. Esimerkiksi ihon epidermiksessä Langerhansin solut kontrolloivat keratinosyyttien jakautumista, pernassa makrofagit poistavat verenkierrosta vanhoja punasoluja ja keuhkoissa makrofagit osallistuvat surfaktantin hajotukseen (36-38).

Eri kudosten makrofagien alkuperä vaihtelee. Jotkut makrofagit, kuten aivojen mikroglia-solut, ovat peräisin raskaudenaikaisen ruskuaispussista ja toiset, kuten Langerhansin solut, puolestaan sikiön maksasta (39). Edellisten kaltaisten pysyvien kudismakrofagien uusiutuminen ja lisääntyminen perustuu pitkälti solujen kykyyn jakaantua (39). Monissa kudoksissa on kuitenkin lyhytikäisiä makrofageja, joita korvataan jatkuvasti veren monosyyteillä, jotka edelleen erilaistuvat kudoksissa makrofageiksi (40). Kudoksissa on kasvutekijöitä, joista tärkeimpänä on M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), jotka vaikuttavat erilaistumiseen (41). M-CSF ja sen reseptorin (CSF1R) kautta tapahtuva signaali ovat välttämättömiä myös makrofagien selviytymiselle sekä proliferaatiolle (40).

3.1.2 Toiminta

Monia makrofagien tehtäviä yhdistää vanhojen, apoptoottisten tai vioittuneiden solujen fagosytoiminen eli solusyönti. Toiminta edellyttää monta vaihetta: vaellus oikealle paikalle, fagosytoitavan solun tunnistaminen sekä hajotus. Apoptoottiset solut vapauttavat "etsi-minut-signaaleja", esimerkiksi ATP ja UTP, jotka kemotaktisesti johdattavat makrofagit oikealle paikalle (42,43). Lisäksi ne ilmentävät solukalvolla "syö-minut-signaaleja", kuten lisääntynyt fosfatidyyliiseriinin määrä ulkokalvolla, joiden avulla makrofagit tunnistavat ne sekä "älä-syö-minua-signaaleja", kuten CD31, joiden

vähyys käynnistää fagosytoinnin (42,44). Makrofagin sisällä fagosytoitu materiaali on kalvon ympäröimän rakenteen, fagosomin sisällä, jossa materiaali hajoaa välivaiheiden kautta. Ensin fagosomi happamoituu, jonka jälkeen se fuusioituu lysosomin kanssa ja lysosomaaliset entsyymit hajottavat fagosomin sisältämän materiaalin (45).

Makrofagit kuuluvat synnynnäiseen immuunijärjestelmään ja ne toimivat ensilinjan immuunipuolustuksessa. Ne ilmentävät kaavantunnistusreseptoreita (PRR, pattern recognition receptor), joiden avulla ne voivat tunnistaa patogeeniin assosioituvia (PAMP) tai kudostuhoon assosioituvia (DAMP) aineita. PAMP (pathogen-associated molecular pattern) on elimistölle vieras rakenne, esimerkiksi viruksen perimää tai bakteerien endotoksiini (42) ja DAMP (damage-associated molecular pattern) puolestaan elimistön omista soluista vaurion tai infektion seurauksena vapautuva aine, kuten histoni tai interleukiini 33 (46).

Esimerkki makrofagien reseptoreista on jätereseptori (scavenger-reseptori), joka tunnistaa myös paljon elimistön omia rakenteita vieraiden partikkelien lisäksi. Niiden tunnistamia rakenteita ovat muun muassa bakteerit sekä lipoproteiinit (47). Suuri merkitys jätereseptoreilla onkin lipoproteiinien aineenvaihdunnassa. Jätereseptoreita on useita, kuten CD36, SRA1 ja LOX-1, ja niiden avulla makrofagit ottavat sisäänsä erityisesti hapettuneita LDL-partikkeleita (48). Reseptoreilla on myös muita tehtäviä kuin tunnistaa rakenteita, sillä ne kiinnittävät makrofageja solunulkoiseen matriksiin ja säätelevät vierasaineiden fagosytointia (47).

Makrofagit tuottavat monia tulehdusta edistäviä sekä hillitseviä välittäjäaineita. Tärkeän ryhmän muodostavat sytokiinit, jotka voidaan edelleen luokitella alaluokkiin, joista esimerkkejä ovat interleukiinit (IL), tuumorinekroositekijät (TNF) ja kemokiinit. Tulehdusta edistävät sytokiinit, kuten IL-1 β ja TNF- α , vaikuttavat ympäri kehoa. Maksassa ne lisäävät akuutin vaiheen proteiinien synteesiä, joista CRP:llä (C-reactive protein) on kliinistäkin merkitystä (49) ja IL-1 β vaikuttaa ihmisen lämmönsäätelyyn, jolloin nousee kuume (50). Laajojen, koko kehoa kattavien vaikutusten lisäksi sytokiinit vaikuttavat myös paikallisesti: IL-1 β aiheuttaa verisuonien laajenemista ja kemokiinit johdattavat immuunipuolustuksen soluja tulehduspaikalle (50,51). Tulehdusta hillitsevien välittäjäaineiden vaikutukset ovat tärkeitä tulehdusvasteen muuntelussa

sekä loppumisessa. Ne muun muassa vähentävät aktivoituneiden makrofagien tulehdusta edistävien välittäjäaineiden eritystä, lisäävät neutrofiilien apoptoosia sekä vähentävät T-solujen proliferaatiota (52-54).

IL-1 β :n ja toisen tulehdusta edistävän välittäjäaineen, IL-18:n, eritykseen liittyy inflammasomin aktivaatio (55). Inflammasomi on solun sisäinen proteiinikompleksi, joka aktivoi välittäjäaineiden esiasteiden pilkkomisen aktiiviseen muotoon (56). Kompleksin puolestaan voivat aktivoida sekä PAMP/DAMP että elimistön muut molekyylit, kuten hapetettu LDL (oxLDL) ja kolesterolikiteet (55,57,58). Aktivaatio on kaksivaiheinen tapahtuma, jossa ensimmäinen vaihe johtaa kompleksin osien geenien luennan lisääntymiseen ja toinen kokoaa sekä aktivoi kompleksin (59). Välittäjäaineiden erityksen lisäksi inflammasomin aktivaatio voi aiheuttaa pyroptoosin, joka on tulehdusta edistävä solukuolema ja jossa on piirteitä sekä apoptoosista että nekroottisesta solukuolemasta (60). Koska monet mikrobit aktivoivat inflammasomin, niin se on oleellinen osa mikrobien aiheuttamassa immuunipuolustuksen vasteeseen elimistössä (61).

Toiminnallisesti makrofagit voidaan jakaa kahteen luokkaan, M1 ja M2, jolloin puhutaan niiden polarisaatiosta. Jako ei ole täsmällinen vaan puhutaan enemmän M1- ja M2-tyyppisistä soluista. Polarisaatio liittyy makrofagien aktivoitumiseen, sillä M1-makrofagit aktivoituvat klassista reittiä interferoni -gamman (INF- γ), mikrobien tai muiden sytokiinien, kuten TNF- α :n, vaikutuksesta ja M2-makrofagit puolestaan IL-4 tai IL-13 vaikutuksesta (62). M1-makrofagit erittävät paljon tulehdusta edistäviä sytokiineja, kuten TNF- α ja IL-1, sekä typpioksidia ja reaktiivisia happiyhdisteitä (63,64). M2-makrofagit puolestaan erittävät enemmän tulehdusta hillitseviä välittäjäaineita, kuten IL-10, ja lisäksi niiden solukalvolla on enemmän mannoosi- sekä scavenger-reseptoreita (64). Mannoosi-reseptorien avulla makrofagit endosytoivat materiaalia ja ne lisäävät myös antigeenien esittelyä muille immuunipuolustuksen soluille (65). M1-polarisaatio johtaa siis makrofagien tulehdusta edistävien ominaisuuksien lisääntymiseen ja M2-polarisaatio liittyy enemmän tulehduksen päättymiseen (64).

3.2 Endoteelisolut

3.2.1 Yleistä

Endoteelisolut muodostavat verisuonissa yhden solun paksuisen kerroksen, endoteelin, joka rajaa verisuonien lumenin puoleisen pinnan. Ne ovat tärkein verisuoniston homeostasian säätelijä osallistumalla verisuonen laajentumisen ja supistumisen tasapainon ylläpitoon, vaikuttamalla trombogeneesiin ja fibrinolyysiin sekä aktivoimalla että inhiboimalla sileälihasten toimintaa (66). Merkittävin rooli endoteelisolulla on toimia esteenä, joka kontrolloi aineiden pääsyä verenkierrasta kudoksiin ja toisin päin (67). Kaikkien edellä mainittujen ominaisuuksien kannalta keskeistä on endoteelisolujen kyky tuottaa erilaisia välittäjäaineita vasteena fysikaalisiin ja kemiallisiin signaaleihin (68).

Esimerkkinä keskeisistä endoteelisolujen tuottamista välittäjäaineista on typpioksidi (NO), jonka tuotantoa säätelevät sekä fysikaaliset että kemialliset tekijät. Verenvirtauksen aiheuttama rasite, esimerkiksi virtauksen haarautuessa, lisää NO:n tuotantoa (69) ja asymmetrinen dimetyyliarginiini (ADMA), jonka määrä lisääntyy muun muassa ateroskleroosissa, puolestaan vähentää sitä (70). NO diffundoituu verisuonen sileään lihassoluun, jossa se saa aikaan relaksaatiota ja siten verisuonen laajentumisen. Lisäksi se vähentää tromboosia, tulehdussolujen adheesiota sekä sileälihassolujen proliferaatiota (66,68). NO estää myös LDL:n hapettumista (71).

3.2.2 Uusiutuminen

Endoteeli uusiutuu jatkuvasti ja sen lisäksi monet tekijät, kuten tulehdus ja eräät lääkkeet, voivat johtaa endoteelisolujen irtoamiseen (72). Uusiutuminen tapahtuu pääasiassa proliferatiivisten paikallisten endoteelisolujen avulla (73). Endoteelisolujen esiasteita löytyy myös verenkierrosta (74). Ne ovat peräisin luuytimeistä ja osallistuvat angiogeneesiin eli uusien verisuonien muodostamiseen, mutta niiden roolia vaurioituneen endoteelin korjauksessa ei tunneta tarkasti (72,75).

3.2.3 Endoteelisolujen muutos mesenkymaalisolujen kaltaiseksi

Endoteelisolujen muuttuminen mesenkymaalisolujen kaltaiseksi (EndMT, endothelial-to-mesenchymal-transition) on prosessi, jossa endoteelisolu saavuttaa mesenkymaalisolun fenotyypin (76). EndMT:n voivat indusoida monet tekijät, muun muassa sytokiinit TGF- β ja INF- γ tai metaboliset syyt, kuten hyperglykemia ja oxLDL (77,78). Prosessin aikana endoteelisoluille ominaisten merkkiaineiden, kuten E-kadheriini ja PECAM1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1), ilmentäminen vähenee ja mesenkymaalisolujen vastaavien, kuten N-kadheriini ja fibronectiini, lisääntyy (78). Muutos tapahtuu asteittain ja välivaiheessa solu voi ilmentää molempien solutyypin merkkiaineita (76).

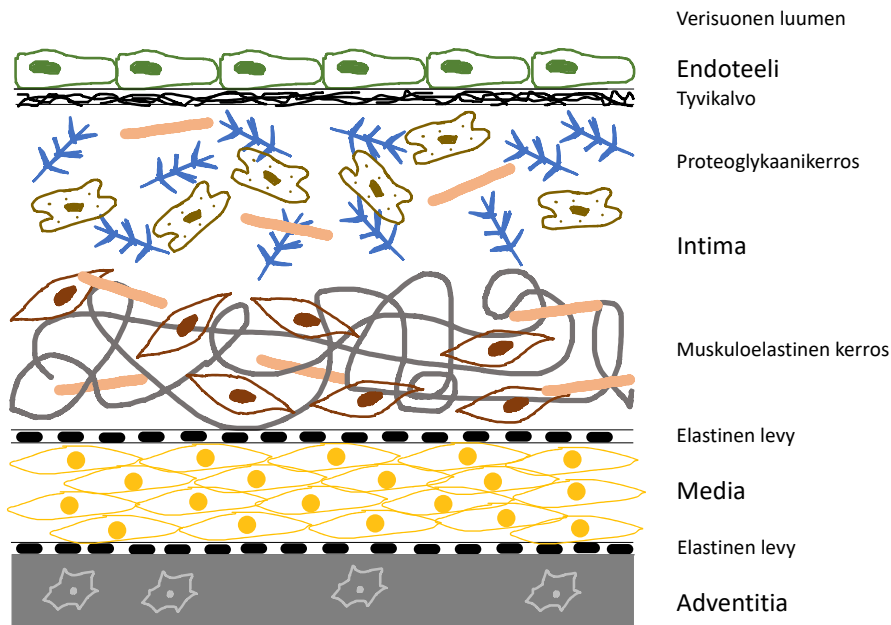
EndMT:n seurauksena endoteelisolujen väliset liitokset ja solujen polaarisuus vähenevät (67). Muodostuneilla mesenkymaalisilla soluilla ei ole enää endoteelisolujen ominaisuuksia, kuten tromboosia estävää vaikutusta tai kykyä angiogeneesiin, vaan ne korvautuvat myofibroblastien ominaisuuksilla: ne pystyvät supistumaan, tuottamaan soluväliaineen proteiineja sekä vaeltamaan sidekudoksessa (76). EndMT vaikuttaa myös endoteeliin ja seurauksena saattaa olla sen läpäisevyyden kasvu, joka edesauttaa muun muassa aterokleroosin kehittymistä (67). Vaikutuksiensa takia EndMT liittyy myös muihin sairauksiin kuin aterokleroosiin, esimerkiksi syöpään ja munuaisten fibroosiin (76). On kuitenkin muistettava, että EndMT ei ole vain patologinen muutos vaan se on tärkeä mekanismi myös verenkiertoelimistön kehityksen kannalta (79).

4 Ateroskleroosin patogeneesi

4.1 Valtimon seinämän rakenne

Valtimon seinämä muodostuu kolmesta kerroksesta: intima, media ja adventitia. Intima koostuu verisuonen luumenia ympäröivästä endoteelisolukerroksesta, endoteelisolujen tyvikalvosta sekä niiden alapuolella olevasta sidekudoksesta. Sidekudos jaetaan edelleen kahteen kerrokseen, joista lähempänä luumenia on proteoglykaanikerros. Siinä on runsaasti proteoglykaaneja, niukasti elastisia säikeitä sekä yksittäisiä sileitä lihassoluja, jotka syntetisoivat solunulkoista matriksia (80). Mediaa lähempänä oleva kerros puolestaan sisältää paljon elastisia säikeitä ja sileitä lihassoluja sekä enemmän kollageenia kuin proteoglykaanikerros. Sitä kutsutaan muskuloelastiseksi kerrokseksi (80). Ateroskleroottisen plakin kehittyminen eli aterogeneesi tapahtuu intimassa.

Elastinen levy erottaa intiman mediasta samoin kuin median adventitiasta. Media koostuu järjestäytyneistä sileälihassoluista sekä elastisista säikeistä. Adventitia puolestaan koostuu löyhästä sidekudoksesta. Adventian verisuonet, vasa vasorum, voivat paksuissa valtimoissa haarautua mediaan asti, mutta intima saa tarvitsemansa ravinteet kokonaan diffuusion avulla (81).



Kuva 3. Normaalin valtimon seinämän rakenne

4.2 Kolesterolin kertyminen valtimon seinämään

Endoteelisolujen merkitys korostuu ateroskleroosin kehityksen eri vaiheissa. Ne ovat metabolisesti aktiivisia soluja, joiden toimintaa säätelevät sekä fysikaaliset että kemialliset tekijät. Tavallisesti endoteelisolut muodostavat yhtenäisen endoteelin, jonka läpäisevyys on säätelyn alaista. Tällöin lipoproteiinien virtaus verenkierrosta intimaan ja niiden määrä intimassa ovat riippuvaisia veren lipoproteiinien konsentraatiosta. Hyperkolesterolemiassa noussut LDL-konsentraatio siis lisää jo itsessään LDL:n määrää intimassa, mutta lisäksi se lisää endoteelin läpäisevyyttä, jolloin LDL:n virtaus intimaan lisääntyy (82). Muita merkittäviä endoteelin läpäisevyyttä lisääviä tekijöitä ovat hyperglykemia sekä korkea verenpaine (83). Endoteelin läpäisevyys vaihtelee myös anatomisten tekijöiden takia, koska valtimoiden haarautumiskohdissa veren virtaus on

pyörteistä, joka johtaa endoteelin fysikaaliseen stressiin. Siksi haarautumiskohdat ovatkin todennäköisiä kohtia ateroskleroosin kehittymiselle (83).

Solujen pinnalla on spesifejä LDL-reseptoreita, jotka tunnistavat apoB100 -apolipoproteiinin ja ottavat LDL:n soluun sisään reseptorivälitteisesti (84). Solujen sisällä entsyymit muokkaavat LDL-partikkelien sisältämiä lipidejä. LDL-reseptorin avulla solut ottavat kolesterolia omia käyttötarkoituksiaan varten, ja samalla säätelevät veren kolesterolipitoisuutta (85). Ylimääräinen kolesterolia luovutetaan HDL:lle. LDL-reseptorivälitteinen LDL:n sisäänotto on säädeltyä, jolloin lisääntynyt kolesterolin määrä solun sisällä johtaa reseptorien vähentyneeseen synteesiin, ja siten estää kolesterolin kertymisen soluun (85).

Ateroskleroosin kehittyminen alkaa LDL:n ja muiden apoB-apolipoproteiinia sisältävien partikkelien, lipoproteiinien remnanttien ja Lp(a):n, kerääntymisellä intimaan (86). Proteoglykaanit osallistuvat merkittävällä tavalla aterogeenisten lipoproteiinien kerääntymiseen (87). Tämä johtuu proteoglykaanien negatiivisesti varautuneiden sulfaattiryhmien ja apoB100:n emäksisten aminohappojen välisistä vuorovaikutuksista (86). Luontaisen LDL:n sitoutumisvoimakkuus ei ole kuitenkaan kovin suuri (34).

Intimassa tapahtuu monia muutoksia LDL:n rakenteessa ja tämä johtaa sen erilaiseen käyttäytymiseen intimassa. Modifikaatiot on käyty hapettavien tekijöiden, PLA₂:n ja SMase:n osilta läpi aikaisemmin (katso luku 2.4.), mutta niiden lisäksi tapahtuu monia muita muutoksia, kuten glykosylaatiota (86). Hapetuksen seurauksena lisääntynyt LDL-partikkelin negatiivinen kokonaisvaraus aiheuttaa sen, että LDL sitoutuu heikommin proteoglykaaneihin (88), mutta muutokset rakenteessa johtavat suurentuneeseen aggregaatio- ja fuusiotaipumukseen. Proteolyyttisten ja lipolyyttisten modifikaatioiden seurauksena muodostuneet aggregoituneet LDL-partikkelit sitoutuvat proteoglykaaneihin luontaisia LDL-partikkeleita tiukemmin, jolloin ne viipyvät intimassa kauemmin ja altistuvat pidemmän aikaa partikkelia muokkaaville tekijöille (19,89). Kaikkien näiden muutosten seurauksena muodostuneet LDL-partikkelit kertyvät intiman solunulkoiseen tilaan ja ovat luontaisia LDL-partikkeleita aterogeenisempia (19).

4.3 Vaahtosolujen muodostuminen

Intiman makrofagit erilaistuvat verenkierron kautta tulleista monosyyteistä. Lipoproteiinien kertyminen intimaan lisää makrofagien määrää ja muokatut LDL-partikkelit toimivat kemotaktisina tekijöinä makrofageille (90). Makrofagit ilmentävät pinnallaan jätereseptoreita, joiden avulla ne fagosytoivat muokattuja lipoproteiineja, erityisesti hapetettuja LDL-partikkeleita (86). Muokatun LDL:n ylimäärän takia makrofagi ottaa enemmän sisään lä LDL-partikkeleita kuin se pystyy käyttämään tai luovuttamaan HDL:lle. Tämä mahdollistuu, koska jätereseptorien kautta tapahtuva LDL:n sisäänotto ei ole säädeltyä kuten on LDL-reseptorilla vaan LDL:n ylimäärä lisää jätereseptoreita makrofagin pinnalla (91).

Lipoproteiineista vapautuva kolesteroli esteröityy ja muodostaa rasvapisaroita sytoplasmaan, jolloin makrofagit muuttuvat vaahtosoluiksi (48). Tarkan säätelyn vuoksi luontainen LDL ei saa aikaan vaahtosolujen muodostusta vaan partikkelin rakenteessa on täytynyt tapahtua modifikaatio, kuten hapettuminen tai hydrolyysi, joka lisää fagosytointia ja siten mahdollistaa vaahtosolujen muodostumisen (25,92). Ylimääräisten lipidien kertyminen intiman solunulkoisesta tilasta makrofageihin on tärkeä vaihe ateroskleroosin kehittymisen kannalta, sillä se aloittaa taudille ominaisten rasvajuosteiden muodostumisen verisuonien seinämiin (86). LDL:n lisäksi VLDL indusoi vaahtosolujen muodostumista, kun makrofagit fagosytoivat niitä VLDL-reseptorien avulla (92). Triglyseridirikkaiden lipoproteiinipartikkelien vaahtosolujen muodostumista indusoiva vaikutus tulee erityisesti ilmi, kun niitä on runsaasti, kuten ruokailun jälkeen (93).

Vaahtosolut erittävät sytokiineja ja proteolyyttisiä entsyymejä, jotka muokkaavat intiman matriksin rakennetta (94). Kun kolesterolin määrä kasvaa edelleen vaahtosolun sisällä, se häiritsee solun toimintaa ja siten laukaisee apoptoosin (95). Apoptoottiset solut poistetaan intimasta muiden syöjäsolujen toimesta. Ateroskleroosin alkuvaiheessa tämä puhdistus on tehokasta, jolloin apoptoosi jopa hidastaa taudin kehittymistä, mutta kehittyneemmässä aterokleroottisessa plakissa epätäydellistä puhdistusta seuraa sekundaarinen nekroosi, jolloin se aiheuttaa tulehdusvastetta (96).

4.4 Tulehdus

Lipoproteiinien kertymisen lisäksi toinen merkittävä tekijä ateroskleroosin patogeneesissä on tulehdusreaktio. Endoteelin vaurio, esimerkiksi hypertension tai hyperlipidemian seurauksena, johtaa endoteelisolujen aktivoitumiseen, jonka seurauksena ne alkavat erittämään tulehdusta edistäviä välittäjäaineita (97,98). Lisäksi endoteelisolut tuottavat solukalvolleen adheesiomolekyyliä, kuten VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) ja P-selektiini, joihin verenkierron kiertävät leukosyytit tarttuvat. Sen seurauksena leukosyytit pyörivät endoteelia pitkin, mikä hidastaa niiden vauhtia ja lopulta pysäyttää sen, jolloin solut pääsevät siirtymään intimaan (99). Endoteelisolujen aiheuttama tulehdusta edistävä vaikutus korostuu erityisesti ateroskleroosin kehittymisen alkuvaiheessa, koska myöhemmässä kehitysvaiheessa immuunipuolustuksen solut vahvistavat ja ylläpitävät tulehdusreaktiota (98).

Intimassa leukosyytit vaeltavat kemokiinien avulla. Monosyytit erilaistuvat makrofageiksi kasvutekijöiden, kuten M-CSF, sekä sytokiinien, kuten $\text{TNF-}\alpha$, vaikutuksesta (100). Makrofagit aloittavat muokattujen lipoproteiinien fagosytoinnin, jonka seurauksena ne alkavat erittämään tulehdusta edistäviä välittäjäaineita (99). Inflammasomin aktivaatio johtaa $\text{IL-1}\beta$ ja IL-18 eritykseen ja muita esimerkkejä makrofagien erittämistä välittäjäaineista ovat kemokiinit sekä $\text{TNF-}\alpha$. Intimaan päästyään T-solut puolestaan aktivoituvat tuottamaan sytokiineja, joiden avulla ne muokkaavat immuunivastetta vuorovaikuttamalla muiden solujen kanssa (98). Th1-auttajasolut tuottavat $\text{INF-}\gamma$:aa, joka edistää tulehdusta, kun Treg-solut puolestaan erittävät sytokiineja, kuten IL-10 ja $\text{TGF-}\beta$, jotka hillitsevät tulehdusreaktiota. Tulehdusreaktion kannalta kolmas tärkeä solutyyppi intimassa on syöttösolu. Aktivoiduttuaan ne erittävät monia entsyymejä, muun muassa tryptaasia ja kymaasia, sekä muita tulehdusreaktiota edistäviä tekijöitä, kuten histamiinia sekä $\text{TNF-}\alpha$:aa (101).

Tulehdussolut vahvistavat ja ylläpitävät tulehdusreaktiota erittamiensä molekyylien avulla. $\text{TNF-}\alpha$ lisää endoteelisoluissa adheesiomolekyylien määrää, vähentää NO-tuotantoa sekä lisää endoteelin läpäisevyyttä (102). Ateroskleroosissa endoteelisolut alkavatkin NO:n sijaan tuottaa enemmän reaktiivisia happiradikaaleja, jolloin solujen tulehdukselta suojaava rooli vaihtuu sitä indusoivaksi (67). $\text{INF-}\gamma$ voi indusoida

endoteelisolujen muutosta mesenkymaalisolujen kaltaisiksi, jolloin ne menettävät muotonsa ja se edelleen lisää endoteelin läpäisevyyttä (77). Muutokset endoteelissa johtavat lisääntyneeseen lipoproteiinien virtaukseen endoteelin läpi sekä uusien leukosyyttien rekrytointiin. Tulehdussoluista erittyy myös kemokiineja, jotka houkuttelevat uusia tulehdussoluja paikalle. Tulehdusta edistävät tekijät, kuten IL-1 ja kymaasi, vaikuttavat myös sileälihassoluihin lisäämällä niiden apoptoosia, joka edelleen vaikuttaa intiman solunulkoiseen matriksiin (98,101). TNF- α ja IL-1 vaikuttavat solunulkoiseen materiaaliin myös aktivoimalla metalloproteaaseja (103), jotka hajottavat matriksi komponentteja, kuten kollageenia. Th1-solujen tuottama INF- γ puolestaan aktivoi makrofageja ja inhiboi sileiden lihassolujen proliferaatiota sekä kollageenin synteesiä (103).

Solujen ja niiden tuottaman matriksin lisäksi tulehdussolujen erittämät molekyylit vaikuttavat myös lipoproteiineihin. Makrofagien ja endoteelisolujen ROS-yhdisteet hapettavat lipoproteiineja ja siten lisäävät vaahtosolujen muodostumista. Sitä lisää myös syöttösolujen tuottama hepariini sitoutumalla LDL-partikkeliin (101). Vaahtosolujen lisääntynyt muodostuminen puolestaan johtaa lisääntyneeseen makrofagien sytokiininieritykseen, joka ylläpitää tulehdusreaktiota. Lisäksi, kuten aikaisemmin käsitelty (katso luku 2.4.2.), PLA₂-modifikaation seurauksena muodostunut lysoPC toimii tulehduksen välittäjänä.

Ateroskleroosin patogeneesissä monet tapahtumat, kuten äsken mainittu lysoPC:n muodostuminen, johtavat tulehdusreaktion voimistumiseen ja tulehdusreaktion voimistuminen indusoi sitä voimistavaa tapahtumaa. Niinpä ateroskleroosissa tulehdusreaktio kroonistuu (104). Makrofagit ovat yllidustettuina ja uusia monosyyttejä rekrytoidaan jatkuvasti verenkierrasta, kuten myös muitakin tulehdussoluja (97). Ateroskleroosin patogeneesin aikana tapahtuu muutos myös makrofagien polarisaatiossa, sillä alkuvaiheessa M2-tyyppisiä makrofageja on enemmän ja loppuvaiheessa puolestaan M1-tyyppisiä (105), jolloin jälkimmäisen solutyypin tulehdusta edistävä vaikutus korostuu.

4.5 Ateroskleroottinen plakki

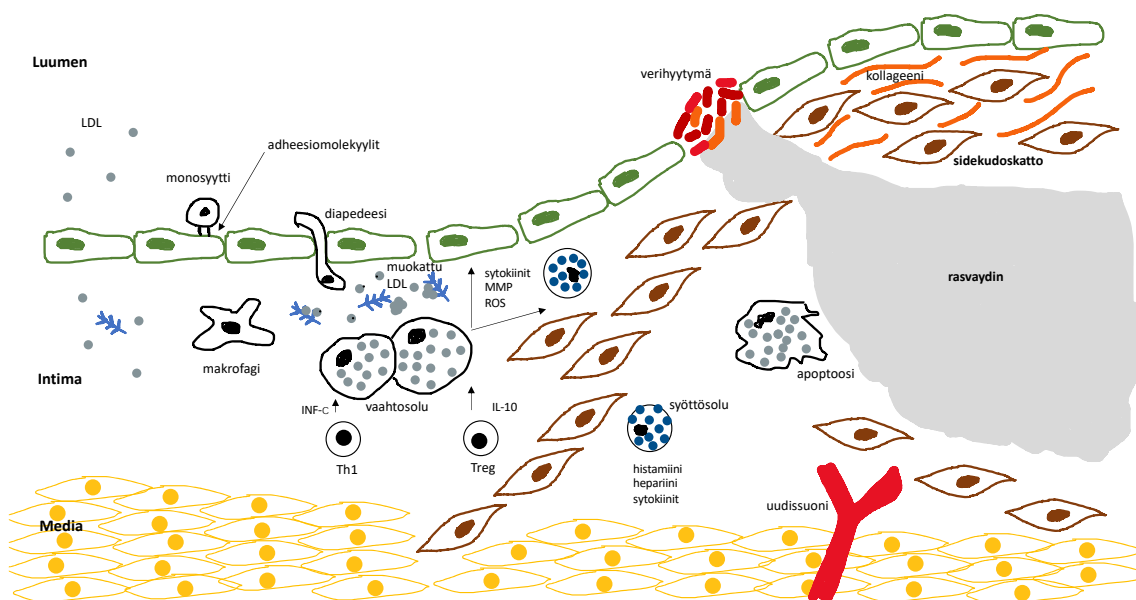
Aterooma eli ateroskleroottinen plakki muodostuu rasvaytimestä ja sen päällä olevasta sidekudoskatosta. Aterooman kehittyminen alkaa rasvajuosteista, joissa kolesteroli on varastoitunut vaahtosolujen sisään. Niiden kehittyminen alkaa jo lapsuudessa/nuoruudessa ja muutokset voivat olla palautuvia (106). Vaahtosolujen apoptoosin ja riittämättömän puhdistuksen seurauksena aiheutuu nekroottista solujätettä, joka voimistaa tulehdusreaktiota. Tällöin kolesterolia kertyy myös solun ulkopuoliseen tilaan, jossa se muodostaa kiteitä (58). Nämä solunulkoiset kolesterolikertymät ja muut rasvakertymät, jotka ovat pääosin peräisin kuolleista makrofageista, muodostavat aterooman rasvaytimen (106). Suurentuessaan lipidikertymät heikentävät ylläolevaa sidekudosrakennetta, jolloin siinä olevat sileät lihassolut aktivoituvat tuottamaan kollageenia ja rasvaytimen päälle muodostuu sidekudoskatto (fibrous cap) (107). Plakin reuna-alueilla puolestaan on erityisen paljon T-soluja, makrofageja sekä syöttösoluja (108).

Kehittyneimmissä plakeissa havaitaan myös kalkkeutumista sekä uudissuonien muodostumista. Kalkkeutuminen vaatii monia toiminnallisia muutoksia plakissa ennen kuin se pystyy tapahtumaan, muun muassa sileiden lihassolujen muuttumisen osteoblastien kaltaiseksi soluiksi, jotka tuottavat luun muodostusta edistäviä tekijöitä (109). Sopivassa ympäristössä kalsium voi muodostaa fosfaatti-ionien kanssa hydroksiapatiittia (107). Uudissuonien muodostumisen ja intiman paksuuntumisen välillä on todettu vahva positiivinen korrelaatio (110). Uudissuonet ovat peräisin ennemmin vasa vasorumista kuin valtimon lumenista ja niiden tehtävä on turvata intiman solujen hapen ja ravinteiden saannin (111).

Plakit jaetaan stabiileihin ja epästabiileihin rakenteen perusteella. Stabiilissa plakissa on pieni rasvaydin ja paksu sidekudoskatto, kun epästabiilissa plakissa puolestaan rasvaydin on suuri ja sidekudoskatto ohut. Sidekudoskatto kasvaa kohti luumenia, jolloin stabiili plakki ahtauttaa suonta enemmän, mutta epästabiili plakilla on suurempi riski revetä ja aiheuttaa komplikaatiota (106).

4.6 Plakin komplikaatiot

Monet tekijät voivat johtaa siihen, että plakki muuttuu repeämiselle alttiiksi. Tulehdusta edistävät välittäjäaineet inhiboivat sileitä lihassoluja ja tulehdussolut erittävät solun ulkoista matriksia hajottavia entsyymejä. Erityisen altis plakin repeämiselle sen etureuna virtaukseen nähden, sillä pyörteinen verenvirtaus aiheuttaa siihen kohtaan suurimman mekaanisen stressin (112). Plakin vaurioituessa endoteeli irtoaa tai repeää, mikä johtaa verihyytymän muodostumiseen. Pieni verihyytymä ei aiheuta oireita, koska se ei tuki verenkiertoa valtimossa, mutta voi stimuloida sileiden lihassolujen kasvua (113). Suurempi verihyytymä voi puolestaan tukkia koko valtimon, jolloin verenkierto sen suonitusalueelle loppuu ja seurauksena on iskemia. Plakin vaurio voi johtaa myös eroosioon, jolloin plakista irtoaa osa ja lähtee verenkierron mukana eteenpäin, jossa se voi tukkia pienemmän suonen. Verenvuotoja voi ilmetä myös plakin sisällä, sillä uudissuonet eivät ole kovin vahvoja rakenteita. Verihyytymät muokkaavat plakin rakennetta ja tekevät siitä yhä vaurioalttiimman. Komplikaatioiden seuraukset riippuvat siitä, mitä elintä valtimot suonittavat. Yleisiä ateroskleroosin komplikaatiota ovat sydän- ja aivoinfarkti sekä katkokävely. Aterokleroosin aiheuttama vaurio valtimon seinämässä voi johtaa myös suonen pullistumaan eli aneurysmaan.



Kuva 4. Ateroskleroosin kehittyminen (114)

5 Materiaalit ja menetelmät

5.1 Monosyyttien eritys

Monosyytit eristettiin verinäytteistä, jotka olivat peräisin Suomen Punaisen ristin Veripalvelusta. Veri siirrettiin matrix- putkiin, joissa oli Ficoll-liuosta. Putkiin lisättiin 1:5000 Versene-PBS -liuosta (Ca/Mg-vapaa fosfaattipuskuroitu suolaliuos (DPBS 1X, Gibco), johon lisätty Versene (CTS™ Versene, Gibco)) ja sentrifugoitiin 700xG. Gradientin keskelle muodostunut valkosolukerros otettiin talteen. Solut pestiin kolmeen kertaan 1:5000 Versene-DPBS -liuoksella, välissä sentrifugoiden solut pohjaan. Viimeisen pesun jälkeen solut suspensoitiin 10 ml:aan RPMI-kasvatusliuosta (RPMI 1640, Lonza), johon lisätty 100 U/ml penisilliini ja 100 µg/ml streptomysiini (Pen-Strep, Gibco) sekä 2 mM L-glutamiini (Glutamax, Gibco). Solujen määrä laskettiin (TC20™, Bio-Rad). Solut maljattiin 24-kuoppalevyille 1 500 000 solua per kaivo, joiden annettiin tarttua alustaan 45-60 minuuttia (inkubaatio-olosuhteet: +37 °C, 95% ilmakosteus, 5% CO₂). Tarttumattomat solut poistettiin pesemällä kaivot kolme kertaa PBS:llä. Soluille lisättiin 0,5 ml/kaivo M-SFM-kasvatusliuosta (Macrophage-SFM, Gibco), johon oli lisätty penisilliini-streptomysiini ja 10 ng/ml makrofagien kasvua stimuloivaa kasvutekijää (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, human GM-CSF, (Human GM-CSF, Miltenyi Biotec)) ja inkuboitiin vuorokausi. Seuraavana päivänä solut pestiin uudestaan PBS:llä ja lisättiin uusi kasvatusliuos, minkä jälkeen soluja kasvatettiin 6-7 vuorokauden ikäisiksi vaihtaen kasvatusliuos kahden vuorokauden välein (115).

5.2 Endoteelisolujen eristys

Solut olivat ihmisen sepelvaltimon endoteelisoluja (human coronary artery endothelial cells, HCAECs, PromoCell), joita oli säilötty nestemäisessä työssä. Solut sulatettiin nopeasti 37 °C veden avulla ja ne siirrettiin kasvatusliuokseen (Endothelial Cell Growth Medium MV (PromoCell), johon lisätty Growth Medium MV SupplementPack (Promocell), 100 U/ml penisilliini ja 100 µg/ml streptomysiini). HCAEC-solut eivät ole herkkiä pakastusliuoksen sisältämälle dimetyylisulfoksidille (Dimethyl sulfoxide, Sigma), joten solut voitiin maljata ilman sentrifugointia 75 cm² kasvatuspulloon. Solujen passage-numero oli 5. Soluja kasvatettiin 6 vuorokautta, jonka aikana media vaihdettiin kaksi kertaa.

5.3 Lipoproteiinien eristys

Lipoproteiinit eristettiin luovuttajien (Suomen Punaisen ristin Veripalvelu) plasmasta. Siihen lisättiin gentamysiinia 0,1 mg/ml ja etyleiinidiamiini-tetra-etikkahappoa (EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma) 3 µg/ml. Plasman suolapitoisuus nostettiin 1,019:ään lisäämällä kaliumbromidia ja sen jälkeen plasma sentrifugoitiin Beckman Coulter Optima™ ultrasentrifuugilla Ti50.2 roottorissa, 40 000 rpm, +4 °C, 24 tuntia. Tällöin VLDL ja IDL nousevat ylös, jotka kerätään ruiskun ja neulan avulla. Myöhemmin puhuttaessa VLDL-partikkeleista tarkoitetaan myös IDL-partikkeleita sisältävää lipoproteiiniseosta. Seuraavaksi plasman suolapitoisuus nostettiin kaliumbromidilla 1,050:een, jolloin sentrifugoinnin jälkeen (30 000 rpm, +4 °C, 24 tuntia) LDL nousi pintaan ja se kerättiin talteen. LDL konsentroitiin nostamalla suolapitoisuus vielä 1,063:een kaliumbromidilta ja sentrifugoinnin jälkeen LDL kerättiin talteen ottaen mukaan sekä tiivis pintakerros sekä leveämpi ja vähemmän tiivis alue. VLDL ja LDL dialysoitiin kaliumbromidin poistamiseksi ja säilytettiin +4 °C 1mM EDTA-150 nM NaCl-liuoksessa (116,117).

5.4 Lipoproteiinien modifikaatiot

5.4.1 Hapetus

LDL ja VLDL hapetettiin kuparisulfaatin (CuSO₄, Copper(II) sulfate, Merck) avulla. Ennen hapetusta lipoproteiinit dialysoitiin PBS-liuoksessa yön yli. Lipoproteiinien joukkoon lisättiin CuSO₄ siten, että sen konsentraatio oli 10 µM. Reaktion annettiin tapahtua yön yli inkubaattorissa (+37° C, 95% ilmankosteus, 5% CO₂). Aamulla reaktio pysäytettiin EDTA:lla, jonka lopullinen konsentraatio oli 4 mM. Hapetettuja lipoproteiineja säilytettiin muiden lipoproteiinien ohella jääkaapissa (+4 °C), kunnes niitä käytettiin solukokeissa.

5.4.2 PLA₂-modifikaatio

PLA₂-modifikaatio tehtiin eri tavalla makrofagi- ja endoteelisolukokeita varten. Makrofageja varten LDL laimennettiin pitoisuuteen 1 mg/ml kalsiumia ja magnesiumia sisältävällä PBS-liuoksella (DPBS, calcium, magnesium, Gibco). Fosfolipaasi A₂ (PLA₂,

Phospholipase A₂ from Naja naja venom, Sigma, kataloginnumero P6139) lisättiin pitoisuudessa 100 mU/ml ja seos inkuboitiin yön yli (37° C). Modifikaatio pysäytettiin EDTA:lla lisäämällä se seokseen pitoisuudessa 10 mM.

Endoteelisoluja varten LDL:n joukkoon lisättiin 200 mM Tris-puskuria (pH 7.0, sisältäen 20 mM Ca²⁺/Mg²⁺ ja 300 mM NaCl), raskasta vettä (dH₂O, Deuterium oxide, Cambridge Isotope Laboratories Inc.) ja fosfolipaasi A₂ (1 U/ml). Seosta inkuboitiin kolme tuntia, jonka jälkeen lisättiin EDTA samoin kuin edellä. Osa seoksesta siirrettiin ultrasentrifuugiputkeen ja se täytettiin raskaalla vedellä, jonka jälkeen näytteet sentrifugoitiin 100 000 x g kaksi tuntia, +4° C (Beckman Coulter Optima TLA-100.3 – roottori). Gradientin ylin 1 ml kerättiin talteen ja LDL:n pitoisuus sekä laatu selvitettiin määrittämällä proteiinit (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) ja vapaat rasvahapot (HR Series NEFA-HR (2), Wako) valmistajien ohjeiden mukaisesti.

5.4.3 Smase-modifikaatio

Modifikaatiota varten LDL laimennettiin pitoisuuteen 1 mg/ml kalsiumia ja magnesiumia sisältävällä PBS-liuoksella. 100 mU/ml sfingomyelinaasi (Sphingomyelinase from Bacillus cereus, Sigma, kataloginnumero S9396) lisättiin lipoproteiinien joukkoon, minkä jälkeen seos inkuboitiin yön yli (37° C). Modifikaatio pysäytettiin EDTA:lla lisäämällä se seokseen pitoisuudessa 10 mM.

5.5 Solukokeet

5.5.1 Makrofagit

Kuudentena tai seitsemäntenä päivänä kasvatettuja makrofagien kasvatusliuokseen lisättiin lipoproteiinit. Ennen sitä jokaiseen kaivoon lisättiin uudessa kasvatusliuoksessa 1 µg lipopolysakkaridia (LPS, Lipopolysaccharides from Escherichia coli O111:B4, Sigma, kataloginnumero L2630), jonka avulla aktivoitiin (priming) makrofagit. Priming kesti 4 tuntia, jonka jälkeen soluille laitettiin lipoproteiineja sisältävä kasvatusliuos. Kontrollikaivoissa poistettu media korvattiin PBS:llä. Altistus kesti 24 tuntia (+ 37° C, 95% ilmankosteus, 5% CO₂).

5.5.2 Endoteelisolut

Endoteelisoluja oli kasvatettu 75 cm² kasvatuspullossa, josta ne irrotettiin trypsiinin (Trypsin/EDTA 1X, Lonza) avulla, laskettiin ja suspensoitiin tiheyteen 1 000 000 solua/ml. Solut maljattiin kokeita varten 24-kuoppalevyille siten, että yhteen kaivoon tuli 50 000 solua (kasvatusliuos (Endothelial Cell Growth Medium MV, PromoCell), johon oli lisätty 100 U/ml penisilliini, 100 µg/ml streptomysiini, 2 mM L-glutamiini ja 10% naudan seerumi (FBS, fetal bovine serum, Gibco)). Soluja inkuboitiin 4 tuntia, jonka jälkeen kasvatusliuos vaihdettiin. Uuteen kasvatusliuokseen oli lisätty naudan seerumin sijasta lipoproteiinivapaata seerumia (LPDS) ja lipoproteiinit/ TGF-β. Kontrollikaivoissa lipoproteiinien tilalla oli PBS:ää. Yhteen kaivoon tuli uutta kasvatusliuosta 1 ml ja soluja kasvatettiin (+ 37° C, 95% ilmankosteus, 5% CO₂) kaksi vuorokautta.

5.6 Makrofagien solunäytteiden kerääminen

Vuorokauden jälkeen kasvatusliuos kerättiin putkiin. Mahdolliset irtosolut sentrifugoitiin pohjaan (200xG, 5 minuuttia), jonka jälkeen kasvatusliuos jaettiin osiin inflammasomiaktivaation ja partikkelikokojen määrittämistä varten. Kaivoista eristettiin lipidit heksaani-isopropanoli -liuoksella ja lopuksi kaivoihin laitettiin 0,2 M NaOH-liuosta 250 µl/kaivo proteiinien määrittämistä varten. Proteiinien määrittäminen tehtiin seuraavana päivänä ja välissä näytteitä säilytettiin jääkaapissa (+4° C).

5.7 Proteiinien määrittäminen

Proteiinien pitoisuus määritettiin BCA Kitillä valmistajan ohjeiden mukaisesti käyttäen naudan seerumin albumiinia standardina.

5.8 ELISA

IL-1β ja IL-18 pitoisuudet määritettiin DuoSet® ELISA Human Total IL-18/Human total IL-1β Kitillä (R&D Systems) valmistajan ohjeiden mukaisesti.

5.9 Partikkelikoon määrittäminen

Kasvatusliuosnäytteitä pipetoitiin 40 µl/kaivo 384-kuoppalevyille, jonka jälkeen näyte sentrifugoitiin kaivon pohjalle (1000xG, 2 minuuttia). Näytteiden päälle pipetoitiin vielä parafiiniöljyä, jonka jälkeen sentrifugointi toistettiin (1000xG, 2 minuuttia). Partikkelikoko määritettiin laserin avulla (DynaPro plate reader 2, Wyatt Technology).

5.10 RNA:n eristys

Endoteelisolujen RNA eristettiin NucleoSpin® RNA Minikitillä (MACHEREY-NAGEL) valmistajan ohjeen mukaisesti. RNA:n pitoisuus selvitettiin spektrofotometrin (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) avulla.

5.11 cDNA:n valmistus

cDNA valmistettiin High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitillä (Thermo Fisher Scientific) valmistajan ohjeiden mukaisesti ilman RNase inhibiittoria. cDNA:n määrä maksimoitiin korvaamalla vesi RNA-näytteellä, jolloin RNA näytettä laitettiin 14,2 µl.

5.12 PCR

GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) on proteiini, jonka erityis on tasaista kaikissa soluissa ja siksi soveltuu käytettäväksi kontrollina PCR:ssä. Kvantitatiivinen RT-PCR tehtiin kontrollin lisäksi VE-kadheriinille, PECAM1:lle, N-kadheriinille ja fibronectiinille (taulukko) SYBR Green (FastStart Universal SYBR® Green Master (ROX), Roche Diagnostics) -menetelmällä.

5.13 Tilastolliset menetelmät

Kokeiden tulokset käsiteltiin Microsoft Officen Excel -ohjelmalla. Aineiston tilastollisessa käsittelyssä käytettiin Studentin t-testiä ja merkitsevyyden rajana pidettiin $p < 0,05$.

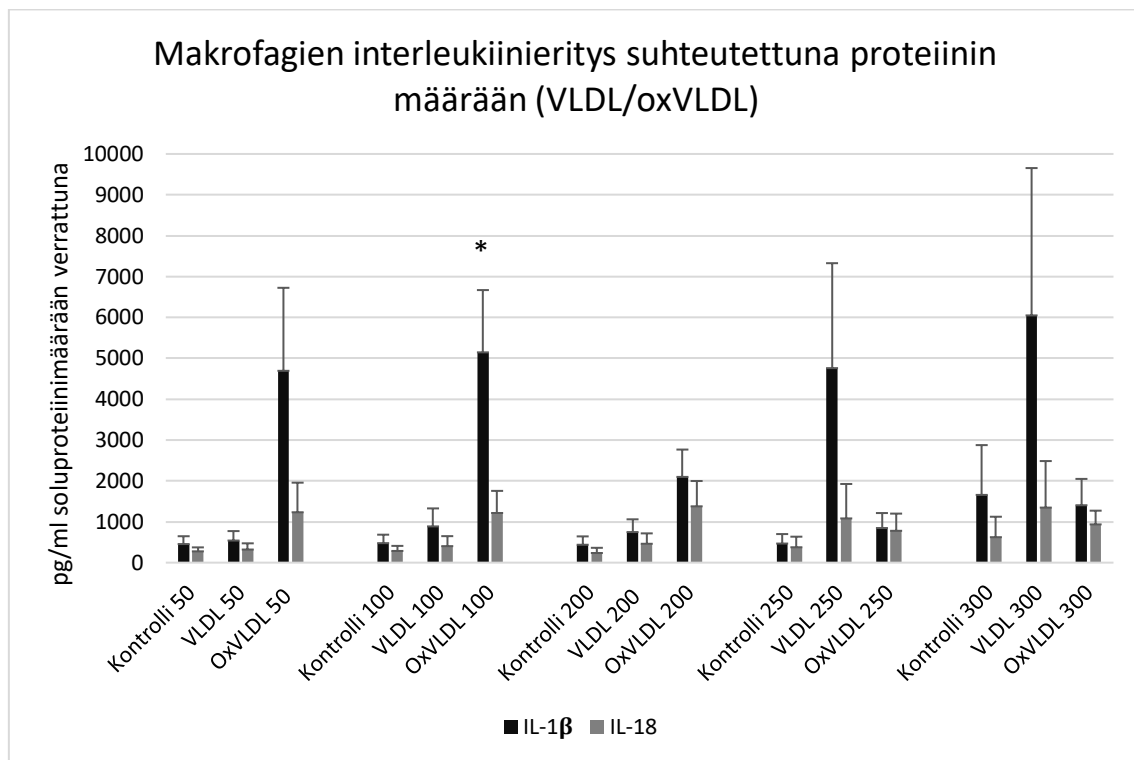
Aluke	Alukkeen sekvenssi (5'-3')
GAPDH F	GTC AAC GGA TTT GGT CGT ATT GG
GAPDH R	GGC AAC AAT ATC CAC TTT ACC AGA GT
VE-kadheriini F	CAG CCC AAA GTG TGT GAG AA
VE-kadheriini R	TGT GAT GTT GGC CGT GTT AT
PECAM1 F	CCC AGC CCA GGA TTT CTT AT
PECAM1 R	ACC GCA GGA TCA TTT GAG TT
N-kadheriini F	GCA CAG ATG TGG ACA GGA TT
N-kadheriini R	CAG CAC AAG GAT AAG CAG GA
Fibronektiini F	CCA CCC CCA TAA GGC ATA GG
Fibronektiini R	GTA GGG GTC AAA GCA CGA GTC ATC

Taulukko 2. Tutkimuksissa käytettyjen geenien sekvenssit

6 Tulokset

6.1 Lipoproteiinien vaikutus makrofagien interleukiinieritykseen

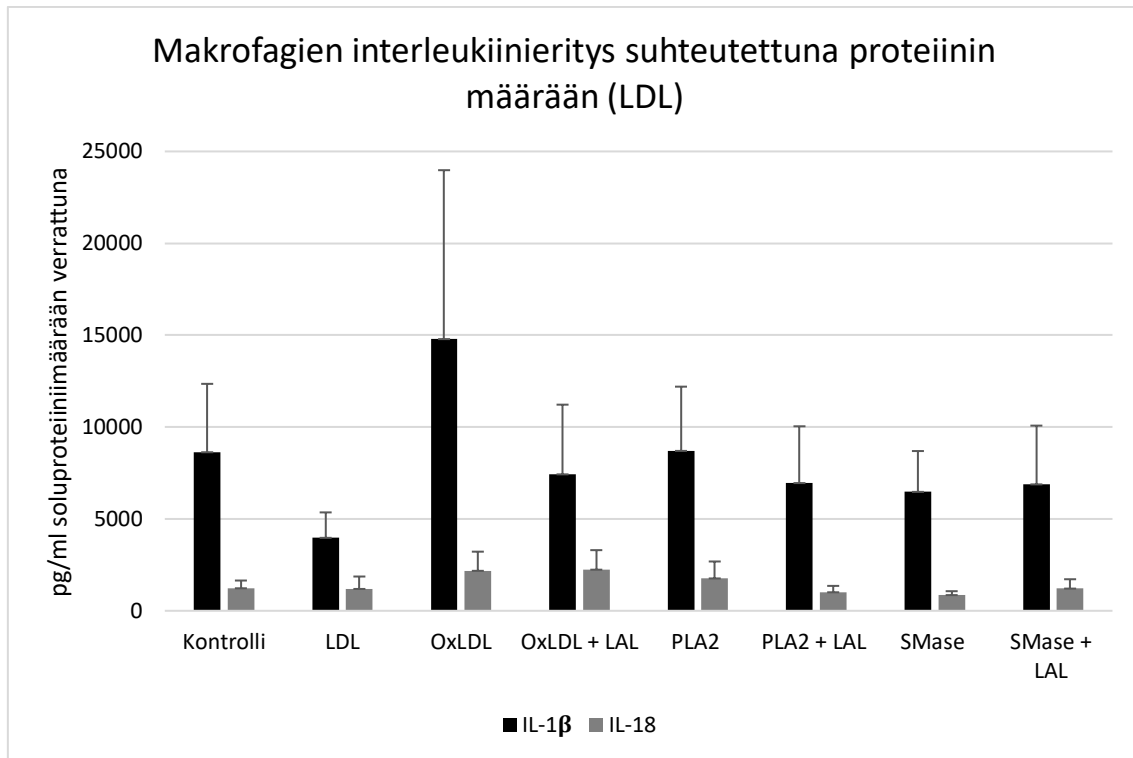
Makrofageja kasvatettiin vuorokausi lipoproteiineja sisältävässä kasvatusliuoksessa, jonka jälkeen niiden IL-1 β ja IL-18 tuotantoa mitattiin kasvatusliuoksesta. VLDL-/oxVLDL-partikkeleita oli eri pitoisuuksina kasvatuskuopissa, 50–300 $\mu\text{g/ml}$, mutta LDL-/muokattuja LDL-partikkeleita oli kaikissa kuopissa 300 $\mu\text{g/ml}$. Kontrollimaljoissa kasvatusliuokseen lisättiin PBS-liuosta lipoproteiineja vastaava tilavuus. Taulukoissa esitetään sytokiinin määrä jaettuna kussakin kasvatusliuoksessa olleen proteiinin määrällä. Proteiinin määrä kuopassa kertoo solumäärästä.



Kuva 5. VLDL:n ja OxVLDL:n vaikutus inflammasomiaktivaatioon. Makrofagit altistettiin VLDL-/oxVLDL-partikkeleille yllä mainituissa pitoisuuksissa (50–300 $\mu\text{g/ml}$) 24 tuntia, jonka jälkeen kasvatusliuos kerättiin talteen. Kasvatusliuoksesta määritettiin interleukiinien pitoisuus ja kaivoista soluproteiinin määrä. Kuvassa on esitetty interleukiinien pitoisuus jaettuna kaivossa olleen proteiinin määrällä. Tulokset ovat neljän kokeen keskiarvot ja virhepalkit havainnollistavat keskivirheen arvojen välillä. * $p < 0,05$.

Matalilla pitoisuuksilla VLDL ei lisännyt merkittävästi interleukiinieritystä kontrolliin verrattuna. OxVLDL puolestaan lisäsi interleukiinien erityistä erityisesti pitoisuuksilla 50

ja 100 µg/ml. Sekä IL-1 β - että IL-18 erityis väheni korkeammissa oxVLDL-pitoisuuksissa kontrollien tasolle, mutta korkeammat VLDL-pitoisuudet puolestaan lisäsivät interleukiinieritystä. Erot kontrolleihin eivät olleet tilastollisesti merkitseviä lukuun ottamatta IL-1 β -eritystä oxVLDL pitoisuudessa 100 µg/ml ($p=0,041$).



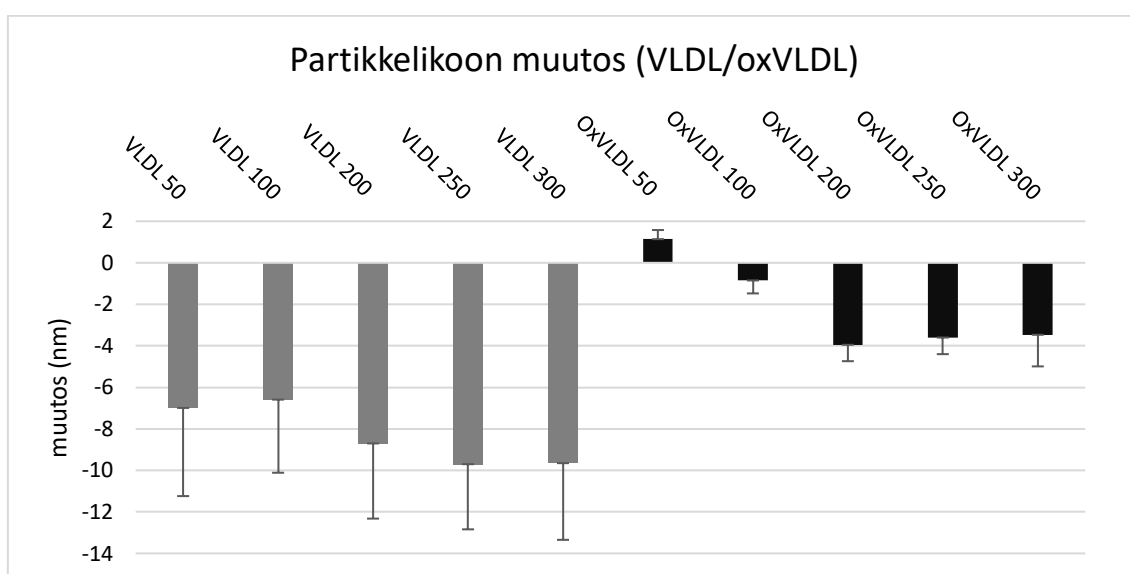
Kuva 6. Modifioidun LDL vaikutus inflammasomiaktivaatioon. Makrofagit altistettiin LDL-/muokatuille LDL-partikkeleille 300 µg/ml 24 tuntia, jonka jälkeen kasvatusliuos kerättiin talteen. Kasvatusliuoksesta määritettiin interleukiinien pitoisuus ja kaivoista soluproteiinin määrä. Kuvassa on esitetty interleukiinien pitoisuus jaettuna kaivossa olleen proteiinin määrällä. Tulokset ovat kuuden kokeen keskiarvot ja virhepalkit havainnollistavat keskivirheen arvojen välillä.

LAL (lysosomal acid lipase) on entsyymi, joka hajottaa lipoproteiinipartikkelin ydintä ja siten lisää vapaan kolesterolin määrää. Näin muodostuu enemmän kolesterolikiteitä, joka voisi edesauttaa inflammasomiaktivaatiota.

Vain oxLDL lisäsi IL-1 β -tuotantoa makrofageissa, mutta IL-18-tuotantoa lisäsi myös PLA2-muokattu LDL. Erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. LAL ei vaikuttanut interleukiinien eritykseen verrattaessa sitä ilman LAL:ia soluille lisättyyn muokattuun lipoproteiiniin.

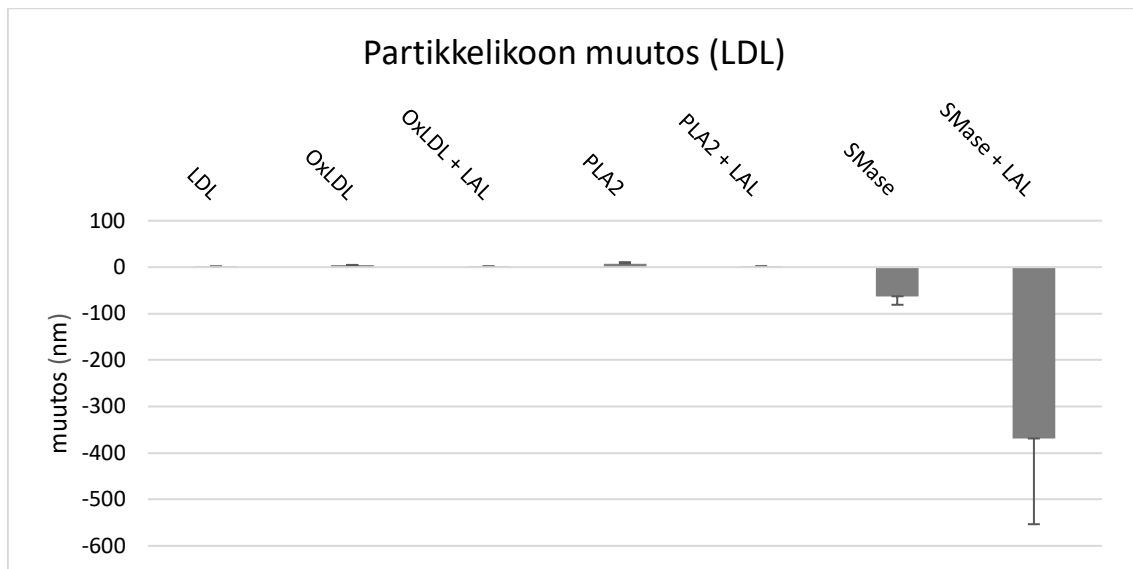
6.2 Lipoproteiinien partikkelikoon muutos makrofagitutkimuksissa

Lipoproteiinien partikkelikoon muutos määritettiin vähentämällä kasvatusliuoksesta määritetystä lipoproteiinin partikkelikoosta alkuperäisten lipoproteiinien partikkelikoko. Alkuperäisen VLDL:n ja oxVLDL:n välillä ei huomattu merkittävää eroa, joten hapetus ei vaikuttanut VLDL:n partikkelikokoon. LDL:n hapetus tai PLA₂-modifikaatio eivät myöskään vaikuttaneet alkuperäisen partikkelin kokoon, mutta SMase-modifikaation seurauksena LDL:n partikkelikoko suureni huomattavasti. SMase:lla muokatuissa lipoproteiineissa huomattiin suurta vaihtelua eri kokeiden välillä.



Kuva 7. Makrofagien vaikutus VLDL:n ja oxVLDL:n partikkelikokoon. Makrofageja kasvatettiin VLDL-/oxVLDL-partikkeleita sisältävässä kasvatusliuoksessa (50–300 µg/ml) 24 tunnin ajan, jonka jälkeen kasvatusliuos kerättiin. Kasvatusliuoksesta määritettiin lipoproteiinien partikkelikoko ja sitä verrattiin alkuperäisten lipoproteiinien partikkelikokoon. Tulokset ovat neljän kokeen keskiarvot.

VLDL-partikkelien koko pieneni keskimääräisesti enemmän kuin oxVLDL-partikkelien. Lipoproteiinin pitoisuus ei vaikuttanut merkittävästi partikkelikoon muutokseen VLDL:n osalta, mutta muutos oxVLDL-partikkeleissa oli merkittävämpää suuremmilla pitoisuuksilla.

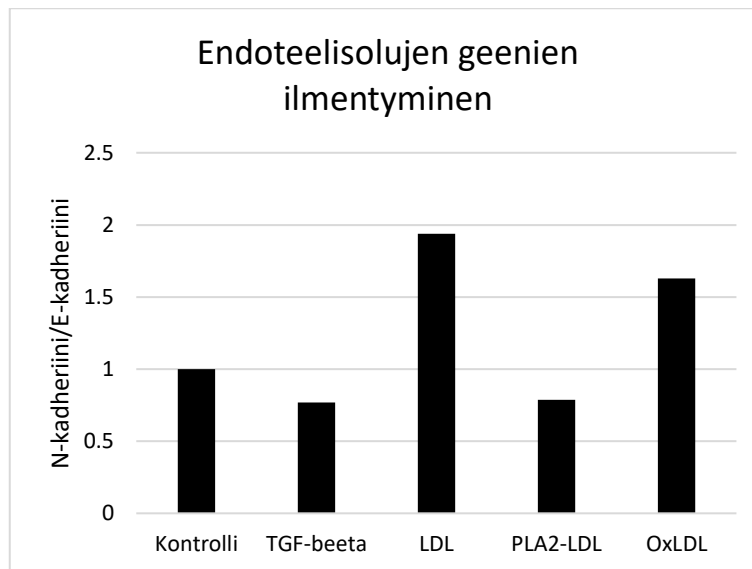


Kuva 8. Makrofagien vaikutus LDL:n ja muokattujen LDL-partikkeleiden partikkelikokoon. Makrofageja kasvatettiin LDL-/muokattuja LDL-partikkeleita sisältävässä kasvatusliuoksessa (300 µg/ml) 24 tunnin ajan, jonka jälkeen kasvatusliuos kerättiin talteen. Kasvatusliuoksesta määritettiin lipoproteiinien partikkelikoko ja sitä verrattiin alkuperäisten lipoproteiinien partikkelikokoon. Tulokset ovat 5-10 kokeen keskiarvot.

Vain SMase-muokatun LDL:n partikkelikoko muuttui merkittävästi altistuksen aikana. Partikkelikoko pieneni huomattavasti, mutta vaihtelu on suurta.

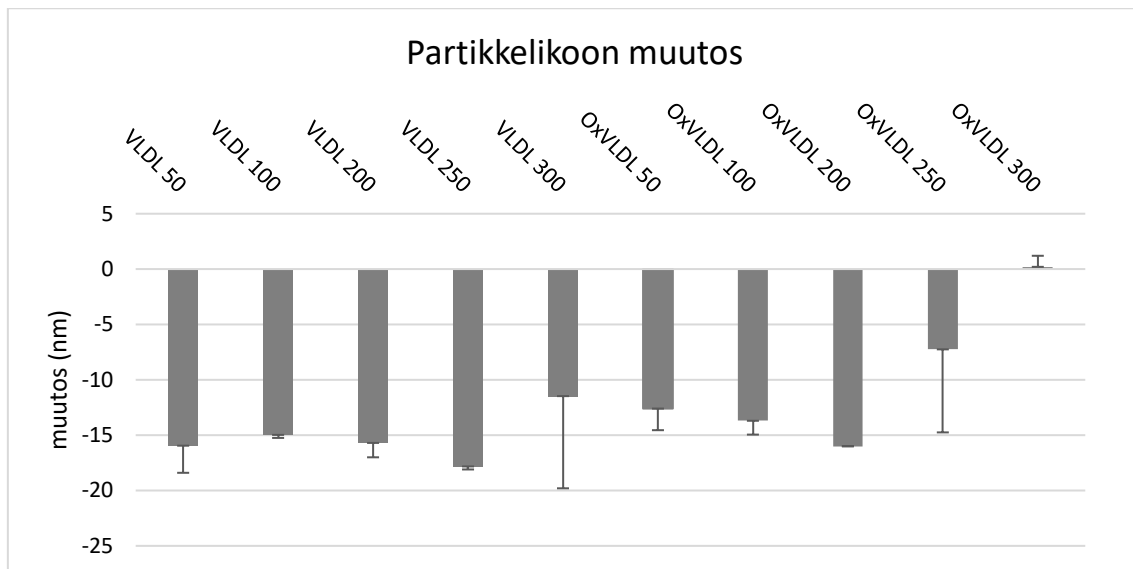
6.3 Lipoproteiinien vaikutus endoteelisoluihin

Endoteelisoluja kasvatettiin kaksi vuorokautta lipoproteiineja sisältävässä kasvatusliuoksessa. Tutkimuksissa käytettyjä lipoproteiineja olivat normaali LDL, oxLDL sekä PLA₂-muokattu LDL. Kontrollikaivossa oli tavallista kasvatusmediaa. TGF-β aiheuttaa EndMT:ksi, joten sitä lisättiin osiin kaivoista ilman lipoproteiineja, jolloin ne toimivat positiivisena kontrollina. Tutkittavia geenejä olivat endoteelisoluille ominaiset PECAM-1 ja E-kadheriini sekä mesenkymaalisoluille ominaiset N-kadheriini ja fibronectiini. Geenien ilmentymistä verrattiin GAPDH:n, joka toimi kontrollina. Kokeen aikana kaikkien geenien ilmeneminen väheni kontrollisoluihin verrattuna, joten verrattiin N-kadheriinin ja E-kadheriinin suhdetta. LDL- ja oxLDL-partikkeleiden kohdalla suhde oli yli yksi, mutta PLA₂-muokatun lipoproteiinin kohdalla se oli alle yksi. Ajan puutteen vuoksi koetta ei ehditty toistaa.



Kuva 9. Geenien ilmentyminen muokatulla LDL-partikkeleilla aktivoiduissa endoteelisoluissa. Endoteelisoluja kasvatettiin lipoproteiineja/ TGF- β :aa sisältävässä kasvatusliuoksessa kaksi vuorokautta. TGF- β :n pitoisuus kasvatusliuoksessa oli 10 ng/ml, LDL:n sekä PLA₂-muokatun LDL:n 200 μ g/ml ja oxLDL:n 100 μ g/ml. Tämän jälkeen soluista eristettiin RNA ja käännettiin se cDNA:ksi, josta tehtiin PCR-määritys. Mesenkymaalisoluille tyypillistä N-kadheriinia verrattiin endoteelisoluille tyypilliseen E-kadheriiniin. Tulokset ovat kahden kokeen keskiarvot.

Tutkittiin myös VLDL:n ja oxVLDL:n vaikutusta endoteelisoluihin sekä lipoproteiinien partikkelikoon muutoksia kasvattamalla soluja yksi vuorokausi lipoproteiinia sisältävässä kasvatusliuoksessa. Lipoproteiinia oli eri pitoisuuksia kasvatuskuopissa, 50-300 μ g/ml ja kontrollikuopissa oli lipoproteiinien sijasta lisätty kasvatusliuokseen PBS-liuosta. IL-1 β eritystä ei mittausmenetelmällä havaittu mediasta. VLDL:n partikkelikoko pieneni lähes yhtä paljon riippumatta sen pitoisuudesta. OxVLDL:n partikkelikoko pieneni eniten pitoisuudessa 200 μ g/ml, josta muutos pieneni sekä suurempaan että pienempään pitoisuuteen mennessä.



Kuva 10. Endoteelisolujen vaikutus VLDL:n/oxVLDL:n partikkelikokoon. Endoteelisoluja kasvatettiin 24 tuntia VLDL-/oxVLDL-partikkeleita (50–300 µg/ml) sisältävässä kasvatusliuoksessa, jonka jälkeen kasvatusliuos kerättiin talteen. Kasvatusliuoksesta määritettiin lipoproteiinien partikkelikoko ja sitä verrattiin alkuperäisten lipoproteiinien partikkelikokoon. Tulokset ovat kahden kokeen keskiarvot.

7 Tulosten tarkastelu

Tutkimuksia toistettaessa korostui variaatio makrofagien interaktioissa lipoproteiinien kanssa. Makrofagit olivat erilaistettu verenluovuttajien monosyyteistä, jolloin tutkimuksen tulokset pohjautuvat heterogeenisen ihmisjoukon makrofagien käyttäytymiseen, ja jokaisen yksilön ollessa erilainen voidaan olettaa myös heidän solujensa käyttäytyvän eri tavalla. Joidenkin luovuttajien makrofagit reagoivat todella voimakkaasti lipoproteiineihin ja tämä näkyi suurina interleukiinipitoisuuksina kasvatusliuoksessa. Osa makrofageista puolestaan tuotti juuri ja juuri havaittavia määriä interleukiineja, vaikka koejärjestely pysyi täysin samana.

Matalat oxVLDL-pitoisuudet (50-100 µg/ml) saivat aikaan kontrolliin verrattuna suuremman interleukiinierityksen makrofageissa. Tilastollisesti merkitsevä ero oli IL-1β-erityksessä pitoisuudessa 100 µg/ml. Oksidaatio tekee siis VLDL-partikkeleista tulehdusta edistäviä. Aikaisemmin PLA₂-muokatun VLDL:n on osoitettu myös indusoivan IL-1β-eritystä (59). Korkeilla oxVLDL-pitoisuuksilla (200-300 µg/ml) interleukiinien erityys väheni eikä erottunut kontrollista. Liiallinen määrä on voinut johtaa solukuolemaan, sillä inflammasomin aktivaatio voi johtaa solussa myös pyroptoosiin. Luontaisen VLDL:n osalta huomattiin päinvastainen ilmiö; matalilla pitoisuuksilla interleukiinien erityys oli kontrollien tasoa, mutta korkeilla pitoisuuksilla erityisesti IL-1β-erityys lisääntyi huomattavasti. Suurilla pitoisuuksilla lipoproteiinit veivät suuren osan soluille annetun kasvatusliuoksen tilavuudesta, jolloin epäoptimaalinen kasvuympäristö saattoi aktivoida soluja. Erot kontrolleihin eivät olleet kuitenkaan tilastollisesti merkitseviä.

Muokatut LDL-lipoproteiinit eivät lisänneet IL-1β-eritystä makrofageista toisin kuin aikaisemmin on näytetty (59). Ero aikaisempaan tutkimukseen saattaa osittain selittyä sillä, että makrofagien erilaistamisessa käytettiin eri kasvutekijää. IL-18-erityksessä ei myöskään huomattu eroa kontrolleihin verrattuna. Kokeiden väliset erot olivat suuria. Joissain muokatut lipoproteiinit indusivat huomattavan interleukiinierityksen, kun toisissa kontrollisolujen erityys oli lipoproteiineille altistettuja suurempaa. Kuuden kokeen keskiarvona nämä arvot tasoittuivat siten, ettei eroa erityksessä kumpaakaan suuntaan huomata.

Makrofagien aktivointiin (priming) käytettiin lipopolysakkaridia, joka tunnetusti lisää makrofagien sytokiinituotantoa (118). LPS voi päätyä ateroskleroottisiin plakkeihin esimerkiksi suun taudinaiheuttajista (119) ja se saa aikaan inflammasomiaktivaation ensimmäisen vaiheen. Aikaisemmin on huomattu, että ilman aktivointia makrofagit eivät reagoi muokattuihin LDL-partikkeleihin (59). LPS:sta huolimatta jotkut solut tuottivat interleukiineja todella heikosti, mikä kertoo osaltaan luovuttajien välisistä eroista.

Modifikaatiot vaikuttivat eri tavalla lipoproteiinien partikkelikokoon. SMase lisäsi partikkelikokoa huomattavasti, kun muut modifikaatiot vaikuttivat vain vähän tai eivät ollenkaan. Soluille annettujen SMase:n muokkaamien lipoproteiinipartikkelien koko vaihteli suuresti, halkaisijaltaan 85 -1858 nm. Näin suuret kokoerot partikkeleissa heijastuvat makrofagien toiminnassa, sillä ne käsittelevät isoja partikkeleita eri tavalla kuin pieniä.

Solukokeiden aikana partikkelikoot pääsääntöisesti pienenevät. VLDL-partikkelien koon pieneneminen ei ollut pitoisuudesta riippuvaista. Tämä saattaa selittyä yksinkertaisesti sillä, että makrofagit hyödynsivät niissä olleita ravintoaineita. VLDL-partikkeleista solut ottavat rasvahappoja ravinnokseen LPL-entsyymien avulla, jolloin rasvahappojen määrä partikkelissa vähenee ja partikkelikoko pienenee. OxVLDL-partikkeleiden koko pieneni VLDL-partikkeleita vähemmän. Ero saattaa johtua siitä, että makrofagit ottavat oxVLDL-partikkelit pääsääntöisesti solun sisään kokonaisina sen sijaan, että entsyymien avulla irrottaisivat siitä lipidejä.

Muutokset LDL:n partikkelikoossa olivat erilaisia kuin VLDL:n suhteen. Luontaisen LDL:n ja oxLDL:n partikkelikoko pysyi solukokeiden aikana samana ja PLA₂-muokattujen puolestaan hieman kasvoi. Sen sijaan SMase-muokatun LDL:n partikkelikoko pieneni huomattavasti solukokeiden aikana, mikä saattaa johtua siitä, että makrofagit hajottavat suuria partikkeleita solun ulkopuolella. Kun makrofagi ei kykene hajottamaan partikkelia fagosytoosilla, se voi muodostaa solun ulkopuolella tilan, jota se ympäröi ulokkeillaan ja johon se vapauttaa lysosomien sisällön (120). Tilan happamassa pH:ssa lysotsomaaliset entsyymit hajottavat partikkelin. Näin suuret SMase-muokatut LDL-partikkelit ovat saattaneet pilkkoutua pienemmiksi solujen ulkopuolella.

Makrofagit vaikuttivat pääsääntöisesti enemmän VLDL-partikkelien kokoon kuin LDL:n. Kattavaa vertailua partikkelien välillä ei voida tehdä, koska VLDL-partikkeleita ei muokattu kaikilla samoilla tekijöillä kuin LDL-partikkeleita. Vähäinen vaikutus luontaisiin LDL- tai oxLDL-partikkeleihin voi johtua siitä, että makrofagit ottavat niitä sisäänsä kokonaisina partikkeleina, kuten mahdollisesti myös oxVLDL:n. Tällöin ne päätyvät hajotettaviksi makrofagien endosomeissa ja siten makrofagin ravintoaineeksi tai niiden sisältämät lipidit kerääntyvät solujen sisään. Nämä johtavat muutoksiin LDL:n ja oxLDL:n määrässä kasvatusliuoksessa, mutta ei niiden partikkelikokoon.

Endoteelisoluilla tutkittiin ennen kaikkea, miten PLA₂-muokatut LDL-partikkelit vaikuttaisivat solujen geenien luentaan ja muutokseen endoteelisolusta mesenkymaalisolun kaltaiseksi. OxLDL:n on aikaisemmin huomattu vähentävän E-kadheriinin sekä lisäävän N-kadheriinin ja fibronectiinin ilmentymistä (78). Tässä tutkimuksessa ei huomattu PLA₂-muokattujen LDL-partikkelien lisäävän mesenkymaalisolulle ominaisten geenien ilmentymistä eikä tutkimusta ehditty toistamaan ajan puutteen vuoksi. Vaikka geenien tasolla muutosta ei huomattu, niin mikroskoopilla katsottaessa lipoproteiineille altistetut endoteelisolut olivat morfologialtaan erilaisia kuin kontrollisolut. Tutkimusta täytyisi jatkaa ja kokeilla erilaisia konsentraatioita, jolloin voitaisiin nähdä paremmin endoteelisolujen vaste.

VLDL tai oxVLDL eivät aiheuttaneet vuorokauden soluviljelyn jälkeen IL-1 β -eritystä endoteelisoluista, vaikka endoteelisoluissa on sama inflammasomi-kompleksi, joka osallistuu makrofageilla interleukiinien eritykseen (121). Lipoproteiinien partikkelikoon muutokset olivat konsentraatiosta ja hapetuksesta riippumatta saman kaltaisia. Endoteelisolut ovat saattaneet käyttää niiden sisältöä ravintoaineina ja samalla pienentäneet partikkelikokoa.

Tämä tutkimus vahvisti muokattujen lipoproteiinien roolia tulehdusta edistävinä tekijöinä. Lipoproteiinit vuorovaikuttavat erityisesti makrofagien kanssa, mikä aiheuttaa muutoksia sekä makrofagien toiminnassa että lipoproteiinien rakenteessa. Makrofagien heterogeenisyys korostui tutkimuksissa. Myöskään ei voida täysin havainnollistaa intimassa olevien makrofagien toimintaa, koska niiden polarisaatio muuttuu plakin kehittymisen myötä. Endoteelisolujen suhteen suurin tutkimuksia rajoittava tekijä oli

aika. Lipoproteiinit vaikuttavat endoteelisoluihin kuitenkin sekä mikroskoopilla nähtävällä että geenien luennan tasolla. Solut puolestaan vaikuttivat lipoproteiinien kokoon tavoin, jotka ovat perusteltavissa ennalta tiedetyn perusteella.

Lähdeluettelo

- (1) Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* 2017 Sep 21;377(12):1119-1131.
- (2) Stancel N, Chen CC, Ke LY, Chu CS, Lu J, Sawamura T, et al. Interplay between CRP, Atherogenic LDL, and LOX-1 and Its Potential Role in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Clin Chem* 2016 Feb;62(2):320-327.
- (3) Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* 2017 Aug 21;38(32):2459-2472.
- (4) Arai H. Oxidative Modification of Lipoproteins. In: Kato Y, editor. *Lipid Hydroperoxide-Derived Modification of Biomolecules* Dordrecht: Springer Netherlands; 2014. p. 103-114.
- (5) Hevonoja T, Pentikäinen MO, Hyvönen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2000;1488(3):189-210.
- (6) Redgrave TG, Roberts DC, West CE. Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. *Anal Biochem* 1975 May 12;65(1-2):42-49.
- (7) Vance JE, Vance DE. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. : Elsevier; 2008.
- (8) Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* 2002;43(9):1363-1379.
- (9) Hirayama S, Miida T. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta* 2012;414:215-224.
- (10) Gerber PA, Nikolic D, Rizzo M. Small, dense LDL: an update. *Curr Opin Cardiol* 2017 Jul;32(4):454-459.
- (11) Ruuth M, Nguyen SD, Vihervaara T, Hilvo M, Laajala TD, Kondadi PK, et al. Susceptibility of low-density lipoprotein particles to aggregate depends on particle lipidome, is modifiable, and associates with future cardiovascular deaths. *Eur Heart J* 2018 Jul 14;39(27):2562-2573.
- (12) Ferretti G, Bacchetti T, Johnston TP, Banach M, Pirro M, Sahebkar A. Lipoprotein(a): A missing culprit in the management of athero-thrombosis? *J Cell Physiol* 2018 Apr;233(4):2966-2981.
- (13) Botham KM, Wheeler-Jones CPD. Postprandial lipoproteins and the molecular regulation of vascular homeostasis. *Progress in Lipid Research* 2013;52(4):446-464.

- (14) Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 2005 Jun 24;96(12):1221-1232.
- (15) Guha M, Gursky O. Effects of oxidation on structural stability and remodeling of human very low density lipoprotein. *Biochemistry* 2010 Nov 9;49(44):9584-9593.
- (16) Keidar S, Kaplan M, Rosenblat M, Brook GJ, Aviram M. Apolipoprotein E and lipoprotein lipase reduce macrophage degradation of oxidized very-low-density lipoprotein (VLDL), but increase cellular degradation of native VLDL. *Metabolism* 1992 Nov;41(11):1185-1192.
- (17) Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004 Oct;84(4):1381-1478.
- (18) Haberland ME, Olch CL, Fogelman AM. Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoproteins with the scavenger receptor of human monocyte macrophages. *J Biol Chem* 1984 Sep 25;259(18):11305-11311.
- (19) Oorni K, Pentikainen MO, Ala-Korpela M, Kovanen PT. Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions. *J Lipid Res* 2000 Nov;41(11):1703-1714.
- (20) Lee S, Birukov KG, Romanoski CE, Springstead JR, Lusis AJ, Berliner JA. Role of phospholipid oxidation products in atherosclerosis. *Circ Res* 2012 Aug 31;111(6):778-799.
- (21) Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992 Oct;13(4):341-390.
- (22) Mathur P, Ding Z, Saldeen T, Mehta JL. Tocopherols in the Prevention and Treatment of Atherosclerosis and Related Cardiovascular Disease. *Clin Cardiol* 2015 Sep;38(9):570-576.
- (23) Ganini D, Mason RP. Absence of an effect of vitamin E on protein and lipid radical formation during lipoperoxidation of LDL by lipooxygenase. *Free Radic Biol Med* 2014 Nov;76:61-68.
- (24) Que X, Hung MY, Yeang C, Gonen A, Prohaska TA, Sun X, et al. Oxidized phospholipids are proinflammatory and proatherogenic in hypercholesterolaemic mice. *Nature* 2018 Jun;558(7709):301-306.
- (25) Eckey R, Menschikowski M, Lattke P, Jaross W. Minimal oxidation and storage of low density lipoproteins result in an increased susceptibility to phospholipid hydrolysis by phospholipase A2. *Atherosclerosis* 1997 Jul 25;132(2):165-176.
- (26) Hakkinen T, Luoma JS, Hiltunen MO, Macphee CH, Milliner KJ, Patel L, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase, is expressed by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 Dec;19(12):2909-2917.

- (27) Zalewski A, Macphee C. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 May;25(5):923-931.
- (28) Oorni K, Hakala JK, Annala A, Ala-Korpela M, Kovanen PT. Sphingomyelinase induces aggregation and fusion, but phospholipase A2 only aggregation, of low density lipoprotein (LDL) particles two distinct mechanisms leading to increased binding strength of LDL to human aortic proteoglycans. *J Biol Chem* 1998;273(44):29127-29134.
- (29) Hanasaki K, Yamada K, Yamamoto S, Ishimoto Y, Saiga A, Ono T, et al. Potent modification of low density lipoprotein by group X secretory phospholipase A2 is linked to macrophage foam cell formation. *J Biol Chem* 2002 Aug 9;277(32):29116-29124.
- (30) Law SH, Chan ML, Marathe GK, Parveen F, Chen CH, Ke LY. An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases. *Int J Mol Sci* 2019 Mar 6;20(5):10.3390/ijms20051149.
- (31) Marathe S, Schissel SL, Yellin MJ, Beatini N, Mintzer R, Williams KJ, et al. Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling. *J Biol Chem* 1998 Feb 13;273(7):4081-4088.
- (32) Sneek M, Nguyen SD, Pihlajamaa T, Yohannes G, Riekkola ML, Milne R, et al. Conformational changes of apoB-100 in SMase-modified LDL mediate formation of large aggregates at acidic pH. *J Lipid Res* 2012 Sep;53(9):1832-1839.
- (33) Schissel SL, Jiang X, Tweedie-Hardman J, Jeong T, Camejo EH, Najib J, et al. Secretory sphingomyelinase, a product of the acid sphingomyelinase gene, can hydrolyze atherogenic lipoproteins at neutral pH. Implications for atherosclerotic lesion development. *J Biol Chem* 1998 Jan 30;273(5):2738-2746.
- (34) Plihtari R, Hurt-Camejo E, Oorni K, Kovanen PT. Proteolysis sensitizes LDL particles to phospholipolysis by secretory phospholipase A2 group V and secretory sphingomyelinase. *J Lipid Res* 2010 Jul;51(7):1801-1809.
- (35) Hume DA. Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system. *Mucosal Immunol* 2008 Nov;1(6):432-441.
- (36) Potten CS, Allen TD. A model implicating the Langerhans cell in keratinocyte proliferation control. *Differentiation* 1976 Jan 13;5(1):43-47.
- (37) Kohyama M, Ise W, Edelson BT, Wilker PR, Hildner K, Mejia C, et al. Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* 2009 Jan 15;457(7227):318-321.
- (38) Carey B, Trapnell BC. The molecular basis of pulmonary alveolar proteinosis. *Clin Immunol* 2010 May;135(2):223-235.

- (39) Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 2013 Oct;14(10):986-995.
- (40) Jenkins SJ, Hume DA. Homeostasis in the mononuclear phagocyte system. *Trends Immunol* 2014 Aug;35(8):358-367.
- (41) Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2008 Jul;8(7):533-544.
- (42) Poon IK, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol* 2014 Mar;14(3):166-180.
- (43) Ravichandran KS. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J Exp Med* 2010 Aug 30;207(9):1807-1817.
- (44) Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992 Apr 1;148(7):2207-2216.
- (45) Kinchen JM, Ravichandran KS. Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 Oct;9(10):781-795.
- (46) Xiahou Z, Wang X, Shen J, Zhu X, Xu F, Hu R, et al. NMI and IFP35 serve as proinflammatory DAMPs during cellular infection and injury. *Nat Commun* 2017 Oct 16;8(1):9.
- (47) Peiser L, Gordon S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect* 2001 Feb;3(2):149-159.
- (48) Chistiakov DA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *J Cell Mol Med* 2016 Jan;20(1):17-28.
- (49) Cray C, Zaias J, Altman NH. Acute phase response in animals: a review. *Comp Med* 2009 Dec;59(6):517-526.
- (50) Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009;27:519-550.
- (51) Palomino DC, Marti LC. Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo)* 2015;13(3):469-473.
- (52) Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991 Dec 1;147(11):3815-3822.
- (53) Headland SE, Norling LV. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol* 2015 May;27(3):149-160.

- (54) Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 2006 Sep;25(3):455-471.
- (55) Hoseini Z, Sepahvand F, Rashidi B, Sahebkar A, Masoudifar A, Mirzaei H. NLRP3 inflammasome: Its regulation and involvement in atherosclerosis. *J Cell Physiol* 2018 Mar;233(3):2116-2132.
- (56) Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002 Aug;10(2):417-426.
- (57) Jiang Y, Wang M, Huang K, Zhang Z, Shao N, Zhang Y, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces secretion of interleukin-1beta by macrophages via reactive oxygen species-dependent NLRP3 inflammasome activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2012 Aug 24;425(2):121-126.
- (58) Rajamäki K, Lappalainen J, Öörni K, Välimäki E, Matikainen S, Kovanen PT, et al. Cholesterol Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages: A Novel Link between Cholesterol Metabolism and Inflammation. *PLoS ONE* 2010;5(7):e11765.
- (59) Lehti S, Nguyen SD, Belevich I, Vihinen H, Heikkilä HM, Soliymani R, et al. Extracellular Lipids Accumulate in Human Carotid Arteries as Distinct Three-Dimensional Structures and Have Proinflammatory Properties. *Am J Pathol* 2018 Feb;188(2):525-538.
- (60) Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature* 2012 Jan 18;481(7381):278-286.
- (61) Elinav E, Strowig T, Henao-Mejia J, Flavell RA. Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunity* 2011 May 27;34(5):665-679.
- (62) Locati M, Mantovani A, Sica A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv Immunol* 2013;120:163-184.
- (63) Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002 Nov;23(11):549-555.
- (64) Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol* 2014 Nov 28;5:614.
- (65) Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J Leukoc Biol* 2012 Dec;92(6):1177-1186.
- (66) Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004 Jun 15;109(23 Suppl 1):32.

- (67) Souilhol C, Harmsen M,C., Evans P,C., Krenning G. Endothelial–mesenchymal transition in atherosclerosis. *Cardiovascular Research* 2018;114(4):565-577.
- (68) Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007 Mar 13;115(10):1285-1295.
- (69) Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol* 2001 Aug;12(4):383-389.
- (70) Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 Sep;20(9):2032-2037.
- (71) Rubbo H, Trostchansky A, Botti H, Batthyany C. Interactions of nitric oxide and peroxynitrite with low-density lipoprotein. *Biol Chem* 2002;383(3-4):547-552.
- (72) Woywodt A, Bahlmann FH, De Groot K, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant* 2002 Oct;17(10):1728-1730.
- (73) Zhang M, Malik AB, Rehman J. Endothelial progenitor cells and vascular repair. *Curr Opin Hematol* 2014 May;21(3):224-228.
- (74) Lu W, Li X. Vascular stem/progenitor cells: functions and signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* 2018 Mar;75(5):859-869.
- (75) Prisco AR, Prisco MR, Carlson BE, Greene AS. TNF-alpha increases endothelial progenitor cell adhesion to the endothelium by increasing bond expression and affinity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015 Jun 1;308(11):1368.
- (76) Li A, Peng W, Xia X, Li R, Wang Y, Wei D. Endothelial-to-Mesenchymal Transition: A Potential Mechanism for Atherosclerosis Plaque Progression and Destabilization. *DNA Cell Biol* 2017 Nov;36(11):883-891.
- (77) Jackson AO, Zhang J, Jiang Z, Yin K. Endothelial-to-mesenchymal transition: A novel therapeutic target for cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med* 2017 Aug;27(6):383-393.
- (78) Su Q, Sun Y, Ye Z, Yang H, Li L. Oxidized low density lipoprotein induces endothelial-to-mesenchymal transition by stabilizing Snail in human aortic endothelial cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018;106:1720-1726.
- (79) Gong H, Lyu X, Wang Q, Hu M, Zhang X. Endothelial to mesenchymal transition in the cardiovascular system. *Life Sci* 2017 Sep 1;184:95-102.
- (80) Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W,Jr, Richardson M, et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 1992 Jan;12(1):120-134.

- (81) Mulligan-Kehoe MJ, Simons M. Vasa vasorum in normal and diseased arteries. *Circulation* 2014 Jun 17;129(24):2557-2566.
- (82) Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Endothelial Barrier and Its Abnormalities in Cardiovascular Disease. *Front Physiol* 2015 Dec 9;6:365.
- (83) Nielsen LB. Transfer of low density lipoprotein into the arterial wall and risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1996 Jun;123(1-2):1-15.
- (84) Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 1981 May 8;212(4495):628-635.
- (85) Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986 Apr 4;232(4746):34-47.
- (86) Morita SY. Metabolism and Modification of Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins Involved in Dyslipidemia and Atherosclerosis. *Biol Pharm Bull* 2016;39(1):1-24.
- (87) Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, Innerarity TL, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 2002 Jun 13;417(6890):750-754.
- (88) Oorni K, Pentikainen MO, Annala A, Kovanen PT. Oxidation of low density lipoprotein particles decreases their ability to bind to human aortic proteoglycans. Dependence on oxidative modification of the lysine residues. *J Biol Chem* 1997 Aug 22;272(34):21303-21311.
- (89) Tozer EC, Carew TE. Residence time of low-density lipoprotein in the normal and atherosclerotic rabbit aorta. *Circ Res* 1997 Feb;80(2):208-218.
- (90) Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989 Oct;84(4):1086-1095.
- (91) Chistiakov DA, Melnichenko AA, Myasoedova VA, Grechko AV, Orekhov AN. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)* 2017 Nov;95(11):1153-1165.
- (92) Allahverdian S, Pannu PS, Francis GA. Contribution of monocyte-derived macrophages and smooth muscle cells to arterial foam cell formation. *Cardiovasc Res* 2012 Jul 15;95(2):165-172.
- (93) Su JW, Nzekwu MM, Cabezas MC, Redgrave T, Proctor SD. Methods to assess impaired post-prandial metabolism and the impact for early detection of cardiovascular disease risk. *Eur J Clin Invest* 2009 Sep;39(9):741-754.
- (94) Arroyo LH, Lee RT. Mechanisms of plaque rupture: mechanical and biologic interactions. *cardiovascres* 1999;41(2):369-375.

- (95) Tabas I. Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol. *Cell Death Differ* 2004 Jul;11 Suppl 1:12.
- (96) Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 Nov;25(11):2255-2264.
- (97) Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis – A matter of unresolved inflammation. *Seminars in Immunology* 2015;27(3):184-193.
- (98) Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012 Sep;32(9):2045-2051.
- (99) Scott J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Curr Opin Genet Dev* 2004 Jun;14(3):271-279.
- (100) Clinton SK, Underwood R, Hayes L, Sherman ML, Kufe DW, Libby P. Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol* 1992 Feb;140(2):301-316.
- (101) Bot I, Shi GP, Kovanen PT. Mast cells as effectors in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015 Feb;35(2):265-271.
- (102) Urbano RL, Furia C, Basehore S, Clyne AM. Stiff Substrates Increase Inflammation-Induced Endothelial Monolayer Tension and Permeability. *Biophys J* 2017 Aug 8;113(3):645-655.
- (103) Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med* 2002 Nov;8(11):1218-1226.
- (104) Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-126.
- (105) Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, Compain C, Gaston AT, Clement M, et al. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One* 2010 Jan 25;5(1):e8852.
- (106) Insull W, Jr. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med* 2009 Jan;122(1 Suppl):S14.
- (107) Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995 Sep 1;92(5):1355-1374.
- (108) Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005 Apr 21;352(16):1685-1695.

- (109) Perrotta I, Perri E. Ultrastructural, Elemental and Mineralogical Analysis of Vascular Calcification in Atherosclerosis. *Microsc Microanal* 2017 Oct;23(5):1030-1039.
- (110) Khurana R, Zhuang Z, Bhardwaj S, Murakami M, De Muinck E, Yla-Herttuala S, et al. Angiogenesis-dependent and independent phases of intimal hyperplasia. *Circulation* 2004 Oct 19;110(16):2436-2443.
- (111) Sun Z. Atherosclerosis and atheroma plaque rupture: normal anatomy of vasa vasorum and their role associated with atherosclerosis. *ScientificWorldJournal* 2014 Mar 20;2014:285058.
- (112) Finn AV, Nakano M, Narula J, Kolodgie FD, Virmani R. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 Jul;30(7):1282-1292.
- (113) Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation* 1996 Oct 15;94(8):2013-2020.
- (114) Wilck N, Ludwig A. Targeting the ubiquitin-proteasome system in atherosclerosis: status quo, challenges, and perspectives. *Antioxid Redox Signal* 2014 Dec 10;21(17):2344-2363.
- (115) Nakanishi S, Vikstedt R, Söderlund S, Lee-Rueckert M, Hiukka A, Ehnholm C, et al. Serum, but not monocyte macrophage foam cells derived from low HDL-C subjects, displays reduced cholesterol efflux capacity. *J Lipid Res* 2009;50(2):183-192.
- (116) Mahley RW, Weisgraber KH, Innerarity TL. Interaction of plasma lipoproteins containing apolipoproteins B and E with heparin and cell surface receptors. *Biochim Biophys Acta* 1979 Oct 26;575(1):81-91.
- (117) Radding CM, Steinberg D. Studies on the synthesis and secretion of serum lipoproteins by rat liver slices. *J Clin Invest* 1960 Oct;39:1560-1569.
- (118) Ando T, Komatsu T, Naiki Y, Takahashi K, Yokochi T, Watanabe D, et al. GSK2656157, a PERK inhibitor, reduced LPS-induced IL-1 β production through inhibiting Caspase 1 activation in macrophage-like J774.1 cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2016 Aug;38(4):298-302.
- (119) Kozarov EV, Dorn BR, Shelburne CE, Dunn WA, Jr, Progulske-Fox A. Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 Mar;25(3):17.
- (120) Haka AS, Barbosa-Lorenzi VC, Lee HJ, Falcone DJ, Hudis CA, Dannenberg AJ, et al. Exocytosis of macrophage lysosomes leads to digestion of apoptotic adipocytes and foam cell formation. *J Lipid Res* 2016 Jun;57(6):980-992.
- (121) Chen Y, Li X, Boini KM, Pitzer AL, Gulbins E, Zhang Y, et al. Endothelial Nlrp3 inflammasome activation associated with lysosomal destabilization during coronary arteritis. *Biochim Biophys Acta* 2015 Feb;1853(2):396-408.